

研究简报

AIE 聚合物纳米粒子的制备及其细胞示踪应用

来守军^{1*}, 张文静¹, 滕思慧¹, 李 乔¹, 杨学琴², 关晓琳²

(1. 兰州文理学院化工学院, 兰州 730000; 2. 西北师范大学 生态环境相关高分子材料教育部重点实验室 甘肃省高分子材料重点实验室 化学化工学院, 兰州 730070)

摘要:水溶性聚集诱导发光 (AIE) 聚合物纳米材料, 作为一类新兴的智能材料, 具有独特的光学性能、环境刺激响应性和优良的生物相容性, 已广泛应用于生物光学成像等领域。本研究首先合成具有 AIE 发光性质的原子转移自由基聚合 (ATRP) 引发剂 TPE-BMP, 然后通过 ATRP 活性聚合方法, 成功制备两亲性聚合物 TPE-PAA, 再自组装构筑出粒径约为 200nm 具有 AIE 发光特性的 pH 响应性球形纳米粒子 TPE-PAA NP。研究结果表明: TPE-PAA NP 具有优异的水溶性、良好的分散性、尺寸稳定性及优异的 AIE 发光特性, 且其溶液荧光对环境 pH 表现出快速敏感响应性能。同时, 经 TPE-PAA NP 染色后的细胞存活率保持在 95% 以上, 表明该纳米粒子具有低的细胞毒性, 并能够有效示踪 *HeLa* 细胞增殖至 9 代以上, 有望作为一种活细胞荧光示踪探针材料。

关键词: 四苯乙烯; 聚丙烯酸; 聚集诱导发光; 纳米粒子; 细胞示踪

荧光生物成像技术由于具有快速有效、灵敏度高、易于实现多通道成像及经济快捷等优势, 已在医学及生物学等研究领域占据了重要的地位^[1~3], 而具有高量子产率、超高光稳定性和优异的生物相容性的各类荧光探针是荧光生物成像技术发展的关键。目前, 应用最为广泛的生物荧光探针是共轭有机荧光小分子探针和荧光量子点。然而, 荧光小分子具有合成复杂、易光漂白、生物毒性高、生物降解性差等缺陷, 限制了其在生物医学中的应用。同样, 含重金属的量子点由于毒性重金属离子 Cd^{2+} 或 Pb^{2+} 的释放会产生毒性 (如 CdSe 、 CdTe 等), 在生物体内会降解并释放二价金属离子从而引发一系列毒副作用, 这也成为含镉类量子点临床应用的障碍。相比之下, 聚合物纳米荧光探针具有小尺寸, 高亮度, 无毒, 稳定等优异荧光特性, 展示出良好的生物应用前景^[4,5]。但是, 传统的聚合物纳米荧光材料往往在稀溶液中具有较强荧光, 但是在浓溶液或聚集状态下, 其荧光量子产率会减小或荧光完全猝灭, 即发生聚集荧光猝灭效应 (aggregation-caused quenching, ACQ)^[6]。由于这种现象的存在, 大部分聚合物荧光纳米粒子在高浓度或者聚集状态下无法展现其优异的光学性能, 从而影响其实际应用效果, 并限制在更多生物领域的应用。因此, 为聚合物纳米荧光探针寻找和开发具有抗 ACQ 效应的新型荧光材料能有效解决上述问题。

幸运的是, 2001 年, 唐本忠院士课题组意外发现硅杂环戊二烯的一系列衍生物的稀溶液几乎不发光, 但随着溶液浓度的不断增加, 其溶液荧光强度呈现规律性增强。他们将这种与 ACQ 截然相反的发光现象称为聚集诱导发光现象 (aggregation-induced emission, AIE)^[7,8], 该发现可以从根本上解决限制传统荧光纳米粒子生物应用的 ACQ 问题。迄今为止, 具有 AIE 发光性能的荧光探针因其在应用中的潜在用途而备受关注, 各种具有 AIE 发光性能的荧光分子陆续被合成出来。其中, 四苯乙烯 (TPE) 有机小分子及其衍生物由于具有优异的 AIE 发光性能、易于合成和修饰等优势, 近年来引起了科学家越来越多的关注^[9], 大量基于 TPE 衍生物的荧光探针被合成开发, 在化学传感^[10]、生物传感^[11~13] 和有机发光二极

10.14028/j.cnki.1003-3726.2022.07.006

收稿: 2021-09-26; 修回: 2021-10-31;

基金项目: 兰州文理学院校级科研项目计划-博士专项计划 (2020BSZX08), 甘肃省自然科学基金 (20JR10RA143, 20JR5RA525), 国家自然科学基金 (21761032, 21965032);

* 通讯联系人: 来守军, 教授, 研究方向为功能荧光材料的绿色合成及生物应用研究。Tel/Fax: 18093118234; E-mail: laishoujun@163.com.

管^[14,15]等领域取得了许多重要的应用成果。到目前为止,一些基于 TPE 的聚合物纳米荧光探针已被成功合成,并成功应用于生物医学成像中^[16~18]。

在已报道的文献中,基于 TPE 的 AIE 型聚合物纳米荧光材料主要通过两种方式制备:一种是通过疏水或 π - π 弱相互作用力,直接用生物相容性好的两亲性聚合物对 TPE 分子直接包覆,此法简称“物理包覆法”^[19];另一种是通过发生化学反应,采用共价键将 TPE 分子偶联到聚合物链段或单体上,再自组装形成 AIE 型聚合物纳米粒子,此法简称“共价键合法”^[20]。通过“物理包覆法”制备聚合物纳米粒子,虽然具有操作简单便利的优势,但是会出现 TPE 分子泄漏、尺寸分布不均匀等缺陷,材料应用稳定性差,导致完全或部分丧失其特有的功能和价值。相比之下,通过“共价键合法”,可以轻松地实现 TPE 分子在聚合物中的均匀分散,并且两者间的界面粘合度较高,形成的纳米粒子致密,有效防止 TPE 分子的泄漏,材料稳定性较好,是聚合物纳米材料制备的理想方式。显然,实现 TPE 荧光小分子共价键合于具有生物相容性的聚合物中,并自组装形成尺寸很小的聚合物纳米结构,是制备优良 AIE 型聚合物纳米荧光材料的关键。然而,目前所报道的基于 TPE 的 AIE 型荧光聚合物纳米材料的制备大多都采用“物理包覆法”,有关通过“共价键合法”合成 AIE 型聚合物纳米荧光材料及生物应用报道相对较少^[21]。

本研究首先设计合成含有原子转移自由基聚合(ATRP)引发剂的 AIE 分子 TPE-BMP,然后采用 ATRP 活性聚合方法,实现生物相容性聚合物聚丙烯酸与 AIE 分子 TPE 的共价键合,形成具有 AIE 发光性能的两亲性聚合物 TPE-PAA,最后通过共沉淀法自组装形成具有 pH 响应性的 AIE 球形纳米粒子 TPE-PAA NP,并研究了它的 AIE 发光性能、pH 响应性能、细胞荧光成像及长效示踪能力。该聚合物纳米粒子具有优异的 AIE 特性、荧光 pH 响应特性及低细胞毒性,在细胞中示踪 9 代后,仍然具有良好的荧光成像性能,具有作为细胞显影或作为生物示踪剂的潜能。因此,本研究所合成的聚合物纳米粒子 TPE-PAA NP 成功地结合了刺激响应型聚合物优良性能和 AIE 特性,为此类智能型聚合物纳米材料的开发提供思路和简单方法,有利于设计并合成新型的具有 AIE 发光现象的多功能材料,使其更好地应用于药物释放、细胞显影、荧光传感器、光学器件、荧光生物探针等相关领域。

1 实验部分

1.1 原料

4-羟基二苯甲酮(98%),锌粉(Zn, AR),四氯化钛(TiCl_4 , 99%),二苯甲酮(BP, 98%),丙烯酸(AA, AR),四氢呋喃(THF, AR),6-溴-1-己醇(99%),乙酸乙酯(ethyl acetate, AR),*N,N*-二乙基乙二胺(*N,N*-diethylethylenediamine, 98%),溴化亚铜(CuBr , 99%),三(2-二甲氨基乙基)胺(Tris(2-dimethylaminoethyl)amine, 99%),石油醚(petroleum, AR),碳酸钾(K_2CO_3 , 99.5%),2-溴-2-甲基丙酰溴(BIBB, 98%),乙醇(EtOH , AR),上述试剂均购买自萨恩化学技术(上海)有限公司,未经纯化直接使用。溴化亚铜(CuBr , 98%)在醋酸中回流 6h 除去杂质;四氢呋喃(THF, AR, 98%)经过钠除水、再蒸馏的方法对其进行了纯化后加分子筛保存备用;本实验中使用的水均为去离子水。高糖培养基(DMEM)、青霉素/链霉素、胎牛血清(FBS)和 0.5%(w/v)胰蛋白酶:生化级,励合生物科技有限公司;HeLa 细胞:甘肃中医药大学基础医学院提供。

1.2 测试与表征

红外光谱(FT-IR)测试采用 Nicolet AVATAR 360 红外光谱仪,采用溴化钾压片法测得;核磁测试采用 VarianMercury(400Hz 和 600Hz,以四甲基硅烷(TMS)为内标)核磁共振仪, CDCl_3 为溶剂;动态光散射(DLS)采用美国 Zetasizer Nano ZS 在室温光源功率 25mW,激光波长 632.8nm 下进行测定;质谱数据由美国质谱联用仪(型号:HP5989B)测得;凝胶渗透色谱仪(型号:GPCV2000)(四氢呋喃 THF 为色谱纯)作为流动相(流速 1.0mL/min)测试温度为 40℃;荧光光谱采用 F97 Pro 荧光分光光度计测得,激发和发射光谱狭缝宽度分别为 10nm 和 10nm,荧光增益为 2;紫外(UV)采用日本岛津 Shimadzu Model

3100 紫外-可见分光光度计进行测定;扫描电镜(SEM)图片由扫描电子显微镜(型号:ZEISS ULTRA PLUS)测得,加速电压 15kV,工作距离 10mm;细胞毒性通过酶标仪(BIOTEK 公司 ELX800 型)在 490nm 处测定;细胞成像通过荧光显微镜(蔡司 Axio Scope. A1)拍摄在 336nm 激发下,处于 460~490nm 发射范围内的荧光图片。

1.3 ATRP 引发剂 TPE-BMP 的合成

1.3.1 4-羟基四苯乙烯的合成 参照文献[20]合成 4-羟基四苯乙烯:将 Zn 粉(20.0g,0.31mol),4-羟基二苯甲酮(9.9g,0.05mol)和二苯甲酮(9.1g,0.05mol)溶解在 200mL THF 中,在氩气保护条件下加入 TiCl_4 (30.0mL,0.27mol),然后回流反应 24h。反应结束后将反应液冷却至室温,在剧烈搅拌下向其中加入 150mL 10%的 K_2CO_3 水溶液,反应 0.5h。然后使用砂芯漏斗对所得到的混合液进行过滤,滤液再用乙酸乙酯萃取三次,合并有机相后通过旋转蒸发除去溶剂乙酸乙酯,最后利用柱层析分离法对粗产物进行分离提纯(洗脱剂: $V_{\text{乙酸乙酯}}/V_{\text{石油醚}}=1/10$),最终得到 6.1g 白色固体产物 4-羟基四苯乙烯,产率约为 35%。 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ): 7.13~6.97 (m, 15H), 6.89 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 6.55 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 4.60 (s, 1H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3 , δ): 153.96 (s), 144.28~143.62 (m), 140.29 (d, $J=33.3\text{Hz}$), 136.37 (s), 132.71 (s), 131.52~131.16 (m), 127.63 (d, $J=15.1\text{Hz}$), 126.24 (s), 114.57 (s)。ESI-MS: $M=348.48$ 。

1.3.2 4-(6-羟基己烷基)四苯乙烯(TPE-OH)的合成 将 4-羟基四苯乙烯(3.48g,0.01mol)、6-溴-1-己烷醇(1.6mL,0.012mol)和 K_2CO_3 (1.66g,0.012mol)溶解在 100mL 无水乙腈中,在氩气保护下回流反应 24h。反应结束后将反应液冷却至室温,随后通过过滤除去固体杂质,滤液蒸发浓缩,最后利用柱层析分离法对粗产物进行分离提纯(淋洗剂: $V_{\text{乙酸乙酯}}/V_{\text{石油醚}}=1/5$),最终得到约 2g 淡黄色固体产物 4-(6-羟基己烷基)四苯乙烯,产率约为 45%。 $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, CDCl_3 , δ): 7.16~7.05 (m, 15H), 6.98 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 6.67 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 3.92~3.85 (m, 2H), 3.65 (t, $J=6.7\text{Hz}$, 2H), 3.45~3.37 (m, 1H), 2.03~1.82 (m, 2H), 1.81~1.75 (m, 2H), 1.67~1.54 (m, 4H), 1.47 (dd, $J=14.2, 9.0\text{Hz}$, 4H), 1.35 (s, 8H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (151MHz, CDCl_3 , δ): 157.64 (s), 144.15~143.96 (m), 140.60 (s), 140.02 (s), 135.96 (s), 132.53 (s), 131.51~131.28 (m), 130.96 (s), 129.86 (s), 128.85 (d), 128.75~128.31 (m), 128.14 (d), 127.79~127.54 (m), 126.42~126.12 (m), 125.97 (s), 125.80 (s), 114.51 (s), 113.60 (s), 77.33 (s), 77.11 (s), 76.90 (s), 67.86 (s), 67.65 (s), 62.92~62.63 (m), 41.08 (s), 32.96~32.45 (m), 29.79~29.30 (m), 29.53~29.30 (m), 29.53~29.23 (m), 28.73 (d), 26.95 (s), 26.15~25.84 (m), 25.62 (d), 25.40 (d), 22.73 (s)。

1.3.3 ATRP 引发剂 TPE-BMP 的合成 TPE-BMP 的合成如图 1 所示。在 250mL 的三口烧瓶中将 TPE-OH (4.48g,0.01mol)、三乙胺(1.75mL,0.0125mol)和 2-溴-2-甲基丙酰溴(1.5mL,0.0125mol)溶解在 150mL 无水 THF 中,室温搅拌反应 24h。反应结束后通过过滤除去固体杂质,滤液蒸发浓缩,最后利用柱层析分离法对粗产物进行分离提纯(洗脱剂: $V_{\text{乙酸乙酯}}/V_{\text{石油醚}}=1/10$),最终得到 3.0g 淡黄色固体产物 TPE-BMP,产率约为 50%。 $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, CDCl_3 , δ): 7.20~7.06 (m, 15H), 6.98 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 6.67 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 3.90~3.84 (m, 2H), 3.67 (t, $J=6.7\text{Hz}$, 2H), 3.45~3.37 (m, 1H), 2.05~2.20 (s, 6H), 1.78~1.58 (m, 8H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (151MHz, CDCl_3 , δ): 172.3 (s), 157.64 (s), 144.15~143.96 (m), 140.60 (s), 140.02 (s), 135.96 (s), 132.53 (s), 131.51~131.28 (m), 130.96 (s), 129.86 (s), 128.85 (d), 128.75~128.31 (m), 128.14 (d), 127.79~127.54 (m), 126.42~126.12 (m), 125.97 (s), 125.80 (s), 114.51 (s), 113.60 (s), 77.33 (s), 77.11 (s), 76.90 (s), 67.86 (s), 67.65 (s), 62.92~62.63 (m), 51.7 (s), 41.08 (s), 32.96~32.45 (m), 33.9(s), 29.79~29.30 (m), 29.53~29.30 (m), 29.53~29.23 (m), 28.73 (d), 26.95 (s), 26.15~25.84 (m), 25.62 (d), 25.40 (d), 22.73 (s)。

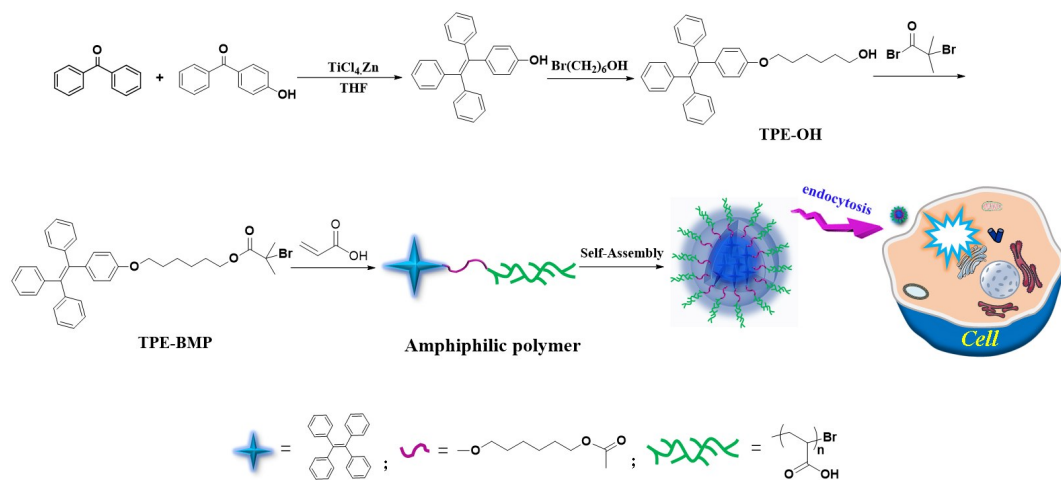


图 1 TPE-PAA NP 的合成路线, 自组装及内吞入细胞的示意图

Figure 1 Preparation, self-assembly and acting on cells of TPE-PAA NP

1.4 聚合物 TPE-PAA 的合成

将丙烯酸(AA)(3.00g, 0.04mol)溶解在 10mL 水和 5mL 甲醇($V_{\text{水}}/V_{\text{甲醇}} = 2/1$)的混合溶剂中搅拌 20min 后在氩气保护下用注射器缓慢滴加 240 μL 三(2-二甲氨基乙基)胺(Me_6TREN), 搅拌 10min 后加入 CuBr (0.0282g, 0.1960mmol), 再搅拌 10min 后加入引发剂 TPE-BMP (0.05g, 0.05mmol), 在室温下聚合 24h。聚合反应结束后, 将反应液滴入沉淀剂乙醇中后出现大量白色絮状沉淀, 离心分离(离心机转速 7000r/min)后, 将所得沉淀用水溶解后再次用乙醇沉淀, 再离心, 如此循环两次, 所得的产物用真空烘箱干燥, 最后得到 1.1g 的白色块状产物 TPE-PAA, 产率约为 34%。

1.5 聚合物纳米粒子的制备

通过纳米沉淀法来制备聚合物荧光纳米粒子 TPE-PAA NP。用无水四氢呋喃溶解 TPE-PAA, 制备浓度为 2mg/mL 的溶液为原液。随后将其稀释至 100 $\mu\text{g/mL}$, 在超声作用下取 10.0mL 注入到装有 20.0mL 超纯水的 50.0mL 比色管中。继续超声 5min, 随后将比色管常温搅拌 24h, 去除有机溶剂后用过滤头过滤得到 TPE-PAA NP。所得纳米粒子非常稳定, 在常温下保存数周后仍保持澄清透明, 并且没有聚集现象发生, $\text{GPC}: M_n = 1.2 \times 10^4$, $M_w = 1.8 \times 10^4$, $\text{PDI} = 1.5$ 。

1.6 细胞毒性检测

以宫颈癌细胞系 *HeLa* 为细胞模型, 采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT 法)检测聚合物荧光纳米粒子 TPE-PAA NP 的细胞毒性。将 *HeLa* 细胞接种在 96 孔板内, 其中 200.0 μL /孔, 而 96 孔板的边缘部分吸取 PBS 进行填充, 随后摇晃孔板并置入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24h。孵育结束后弃置原始培养基, 将实验分成 6 组, 其中第一个对照组加入 180.0 μL /孔 DMEM, 其余的实验组分别加入浓度为 40、80、120、160、200 $\mu\text{g/mL}$ TPE-PAA NP 的 180.0 μL /孔的培养基后进行 MTT 实验。加样结束后摇晃孔板并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中再孵育 24h。随后再加入 20.0 μL /孔 MTT 溶液(5mg/mL)放入培养箱中继续孵育 4h 后将液体吸出, 并向每孔中加入 150.0 μL DMSO 使反应终止, 摇晃孔板至结晶物质溶解即可。用酶标仪在 490nm 处测定每孔的吸光度 OD 值, 进行 3 次平行实验。细胞存活率计算公式如下:

$$\text{Cell survival\%} = \text{ODr} / \text{ODc} \times 100\% \quad (\text{ODr 为实验孔测定的吸光度, ODc 为对照组测定的吸光度})$$

1.7 细胞成像实验

选取生长较好的 *HeLa* 细胞进行消化离心后, 用显微镜在计数板上计数, 随后接种于 12 孔板, 并加入含有 12% FBS 的 DMEM 培养液摇晃后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24h 后向每孔打入 200 $\mu\text{g/mL}$ 的

TPE-PAA NP,再孵育 24h。最后用 PBS 缓冲液洗涤取出的细胞爬片,并进行最后的成像观察实验。使用荧光显微镜(蔡司 Axio Scope, A1)拍摄在 336nm 激发下处于 460~490nm 发射范围内的荧光图片。

2 结果与讨论

2.1 TPE-PAA 结构表征

聚合物 TPE-PAA 的分子结构可通过核磁氢谱(如图 2a)进行确定。化学位移 6.25ppm 左右处出现的特征信号峰为芳环上的质子峰,3.59 和 3.40ppm 处分别为 TPE-PAA 上的亚甲基信号峰,3.06ppm 处为甲基的氢峰。上述特征峰的出现证明了聚合物 TPE-PAA 的分子结构。此外,在 TPE-PAA 的红外谱图(图 2b)中,在 3417cm^{-1} 处出现了羧酸上的—OH 的特征吸收峰,同时在 1718cm^{-1} 处出现了羰基的特征吸收峰,两个特征峰的出现证明合成产物 PAA 结构的存在,从而进一步证明 TPE-PAA 的结构。

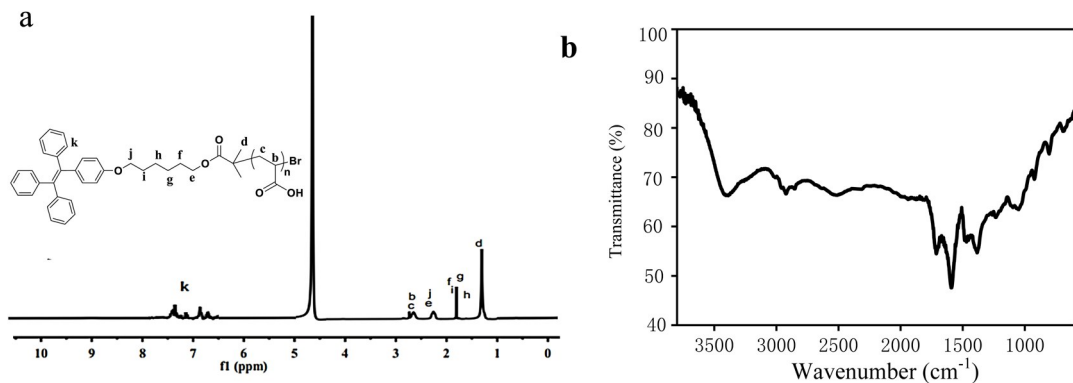


图 2 (a) TPE-PAA 的核磁氢谱图(600MHz, D_2O);(b) TPE-PAA 的红外谱图

Figure 2 (a) ^1H -NMR (600MHz, D_2O) spectrum of TPE-PAA; (b) IR spectrum of TPE-PAA

2.2 TPE-PAA NP 的自组装行为研究

本研究所制备的 TPE-PAA 为一种两亲性聚合物,其中疏水部分由 TPE 和己烷基链组成,亲水部分由 PAA 组成,三者均易于在合适的溶液中自组装形成有序纳米结构。在此,我们选择四氢呋喃(THF)为溶剂,超纯水为分散介质,采用纳米沉淀法制备 TPE-PAA 自组装体,得到外观均一稳定的聚合物纳米粒子 TPE-PAA NP,该 NP 是以疏水的 TPE 和己烷基链为壳核,亲水的 PAA 为外壳的实心纳米微球。图 3 为 TPE-PAA NP 的 SEM 图和粒径分布图。从图 3(b)的插图可以观察到 TPE-PAA NP 的水溶液(0.05mg/mL)具有良好透明性和明显丁达尔效应,表明 TPE-PAA NP 在水溶液中能自组装形成纳米粒子。由图 3(a)可以观察到 TPE-PAA NP 为规则小球状,具有较好的分散性。这主要是由于在水溶液中两亲性聚合物链发生折叠和塌陷,导致聚合物链疏水部分收缩包覆于 NP 内部,聚合物链亲水部分暴露于 NP 的外部,从而自组装成小球,使得 NP 均匀分散于水相中。此外,通过 DLS 方法测得的 NP 粒径(图 3b)在一定程度上比通过 SEM 照片获得的粒稍微偏大,这是因为聚合物 TPE-PAA 分散在水溶液中时会发生轻微的膨胀,动态光散射结果显示这些纳米粒子的流体力学大小保持在 200nm 左右。

2.3 TPE-PAA 的 AIE 特性

由于 TPE-PAA NP 中包含具有 AIE 发光性能的 TPE 荧光小分子,因此我们考察了 TPE-PAA NP 的 AIE 特性。为了研究 TPE-PAA NP 的聚集程度与荧光强度的影响关系,进而研究其 AIE 性能,我们分别通过逐步增大 TPE-PAA NP 水溶液浓度及加入不良溶剂后测试其溶液荧光强度变化的两种方法来验证其 AIE 特性。首先,考察 TPE-PAA NP 的浓度变化对荧光的影响,如图 4 所示,当 TPE-PAA NP 水溶液浓度由 $1.0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增大到 $20.0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其位于 460nm 处的蓝色荧光强度会随着聚合物浓度的增大而增强。这主要是由于随着 TPE-PAA NP 浓度的不断增大,PAA 聚合物链的收缩及团聚会增

强链端 TPE 分子的聚集程度,从而使得荧光强度显著增强,表现出 TPE 分子明显的 AIE 特性,证明 TPE-PAA NP 具有 AIE 特性。

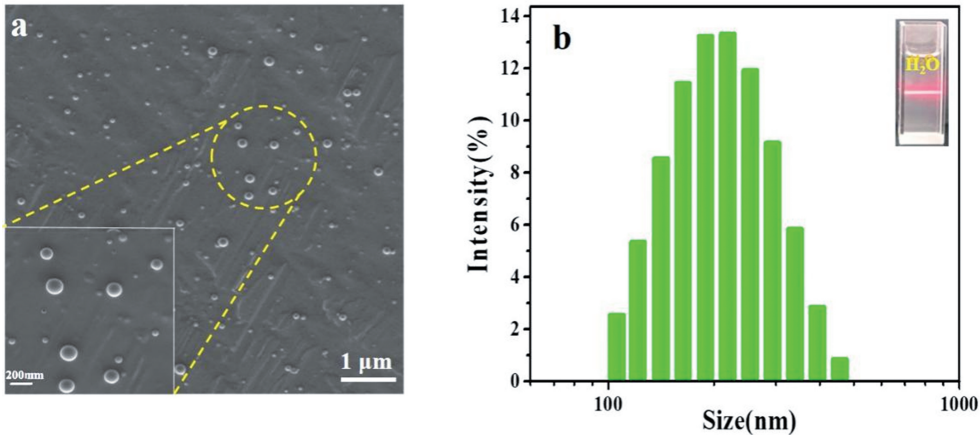


图 3 (a)TPE-PAA NP 的 SEM 谱图;(b) 浓度为 1mg/mL 的 TPE-PAA 水溶液流体动力学尺寸, 右上角插图为在激光照射下 TPE-PAA NP 水溶液产生的丁铎尔效应数码照片

Figure 3 (a) SEM image of TPE-PAA NP; (b) The particle size distribution histograms of TPE-PAA NP with a concentration of 1mg/mL. Inset: Photograph of TPE-PAA NP in water under irradiation of laser point

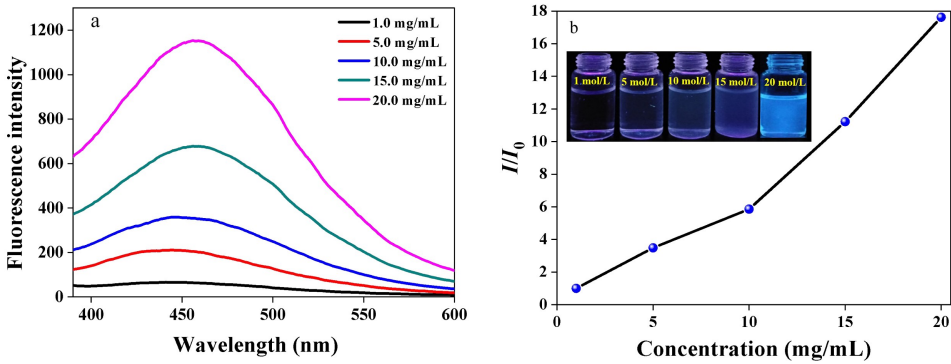


图 4 (a)不同浓度 TPE-PAA NP 水溶液的荧光光谱(激发波长为 360nm);(b) TPE-PAA NP 水溶液位于 460nm 处荧光强度随浓度的变化曲线图,插图为紫外灯照射下(365nm)的数码相片

Figure 4 (a) Fluorescence spectra of aqueous solutions of TPE-PAA NP at different concentrations ($\lambda_{\text{ex}} = 360\text{nm}$); (b) Relative changes in fluorescence intensity at 460nm of different concentrations of NP aqueous solution and digital photographs under UV light (365nm)

为了进一步验证 TPE-PAA NP 的 AIE 性质,我们考察了不同比例不良溶剂的加入对 TPE-PAA NP 溶液荧光强度的影响。我们选用 THF 作为 TPE-PAA NP 的良溶剂, CH_2Cl_2 作为不良溶剂,分别测试了不同体积分数的 THF/ CH_2Cl_2 混合溶剂中 TPE-PAA NP 的荧光变化情况。如图 5 所示,在向 NP 的 THF 溶液中滴加不良溶剂 CH_2Cl_2 的过程中,可以观察到随着 CH_2Cl_2 体积分数的增大,TPE-PAA NP 溶液的蓝色荧光强度均以非线性的方式逐渐增强,且当 CH_2Cl_2 的体积分数增大至 60% 后,TPE-PAA NP 溶液的荧光强度显著增强,最高增强 4.5 倍之多。由此说明,体系中 NP 聚集程度的变化对蓝色荧光具有显著影响。这主要是在良溶剂中,TPE-PAA NP 上的聚合物链呈现舒展状态,这给予链上的 TPE 分子较大的运动空间,当其被激发后,可以通过四个苯环的振动,将大部分能量以热能的形式释放,导致荧光发射减弱。而当在 NP 良溶液中加入其不良溶剂后,随着其溶解度的下降,聚合物链将发生卷曲和紧缩,导致纳米微球核心位置的 TPE 发生聚集,分子之间靠近,使得分子运动空间变小,进而使 TPE

分子中苯环的振动转动等运动受限,分子无法释放热能,能量则以辐射跃迁的方式释放出去,增强了荧光强度,并且荧光强度还会随着聚集程度的不断增加而呈现出一个持续增强的形式,这与文献中所报道的 TPE 分子的 AIE 发光特性相一致^[17],从而证明 TPE-PAA NP 具有优异的 AIE 发光性能,这有利于其进入细胞后在高浓度状态下或聚集状态下发出明亮的荧光,有望成为一种理想的生物荧光探针。

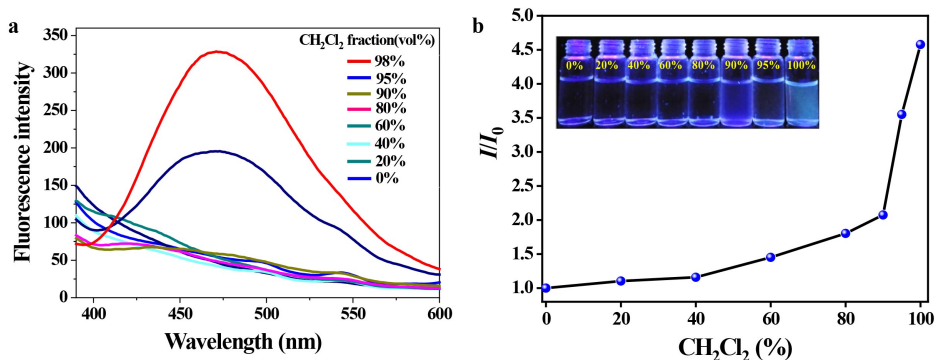


图 5 (a) 在 THF/CH₂Cl₂ 混合溶剂中 TPE-PAA NP 溶液的荧光光谱(激发波长为 360nm);

(b) TPE-PAA NP 在 EtOH/CH₂Cl₂ 混合溶剂中双色荧光强度的相对变化及其在紫外灯下(365nm)的数码相片

Figure 5 (a) Fluorescence spectra of TPE-PAA NP in a mixed solvent of THF/CH₂Cl₂ ($\lambda_{ex} = 360\text{nm}$);

(b) The relative change in fluorescence intensity of TPE-PAA NP in a THF/CH₂Cl₂ mixed solvent and its digital photograph under UV light (365nm)

2.4 TPE-PAA NP 的 pH 响应特性

近年来,具有 pH 敏感响应的的两亲性聚合物在肿瘤靶向给药方面具有潜在的应用前景。众所周知,PAA 是一种典型的具有 pH 响应特性的水溶性聚合物,其在酸性和碱性环境中分别表现出完全不同的构象。因此,我们通过测试 TPE-PAA NP 在不同 pH 水溶液中荧光强度的变化,研究了其荧光对 pH 的响应性。如图 6 所示,当将 20mg/mL 的 TPE-PAA NP 水溶液的 pH 从 1.5 调高至 13.3 时,其荧光强度随着 pH 的升高呈非线性增强趋势。这主要是因为,在酸性环境中 PAA 侧链上的—COOH 质子化作用促使其聚合物链发生收缩,而 TPE-PAA NP 表面存在大量 PAA 链作为壳层,NP 的亲水性外壳随着酸度的增加而不断收缩,从而限制了位于 NP 内部的 TPE 分子间的聚集,导致在低 pH 下荧光强度降低。与此相反,当 pH 值逐渐增加到碱性环境时,PAA 侧链上的大部分—COOH 脱质子并以—COO⁻ 阴离子的形式存在。由于—COO⁻ 基团间的静电斥力使分子链伸展,导致 TPE-PAA NP 的亲水性外壳处于膨胀状态,从而使位于 NP 内部的 TPE 分子间被释放出来,在水相中实现聚合物链间 TPE 分子之间的聚

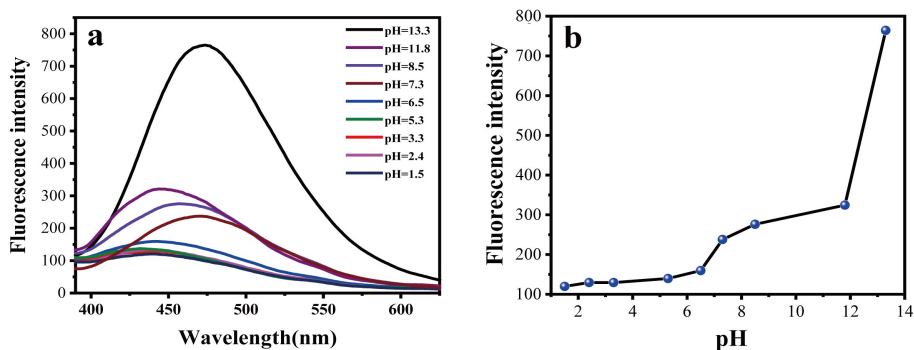


图 6 (a) TPE-PAA NP 溶液 (20mg/mL) 在不同 pH 溶液中的荧光光谱;(b) 不同 pH 下 TPE-PAA NP 溶液中的荧光强度变化曲线

Figure 6 (a) Fluorescent spectra of the TPE-PAA NP (20mg/mL) in different pH solutions; (b) Change of fluorescent intensity of TPE-PAA NP in aqueous solution under different pH

集,产生 AIE 效应,从而导致荧光强度随 pH 增加而增强的现象。上述结果表明,TPE-PAA NP 具有较优异的 pH 荧光敏感特性。

2.5 TPE-PAA 的细胞毒性及细胞成像研究

具有荧光发射功能的 TPE-PAA NP 的细胞毒性是决定其能否成功应用于细胞成像的前提条件。我们首先选取宫颈癌细胞 *HeLa* 作为测试 TPE-PAA NP 细胞毒性的样本,采用 MTT 法对 NP 的细胞毒性进行了测试,结果如图 7 所示。当将 *HeLa* 肿瘤细胞置于 50~400 $\mu\text{g/L}$ 的 TPE-PAA NP 水溶液中培养 48h 后,对所有培养浓度来说,*HeLa* 肿瘤细胞活性均在 90% 以上,这表明 TPE-PAA NP 对肿瘤细胞具有较低的细胞毒性,可以进一步应用于细胞成像实验。

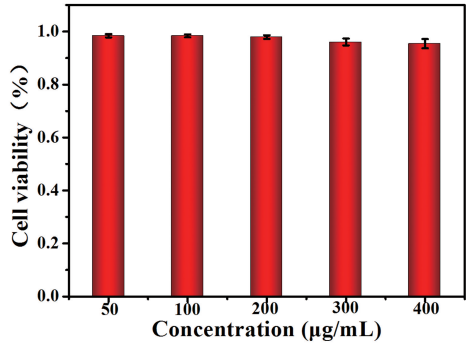


图 7 用不同浓度的 TPE-PAA NP 处理 48h 后 *HeLa* 细胞毒性测试
Figure 7 *HeLa* cytotoxicity test after 48 h treatment with different concentrations of TPE-PAA

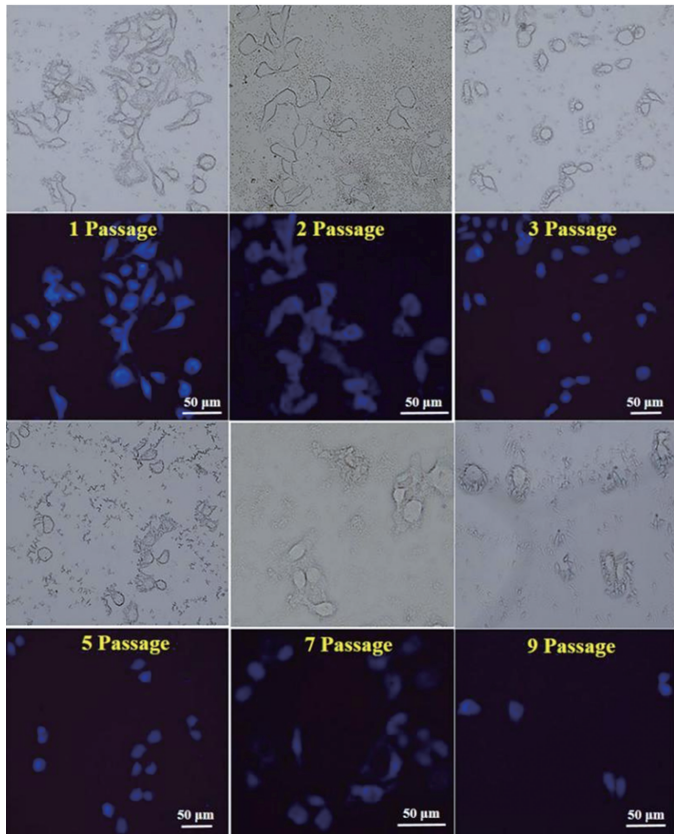


图 8 TPE-PAA NP 染色 *HeLa* 细胞不同代数的共聚焦显微镜图像
Figure 8 Confocal microscopy images of *HeLa* cells TPE-PAA NP staining (100 $\mu\text{g/mL}$) in different algebras

基于 TPE-PAA NP 优异的 AIE 发光特性和低细胞毒性,对其进行细胞荧光示踪研究。在进行细胞成像实验时,先在生理环境下将 *HeLa* 肿瘤细胞置于 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 TPE-PAA NP 水溶液中培养 24h,然后使用荧光显微镜拍摄蓝色激发光源照射下不同代数的荧光显微照片,如图 8 所示。通过荧光显微照片,我们可以清楚地观察到:经由 TPE-PAA NP 染色 24h 后的 *HeLa* 细胞在蓝色通道的激发光照射下可在细胞内接收到强烈的蓝色荧光信号。其中,细胞内荧光强度相对较弱的区域是细胞核的位置,表明该纳米粒子选择性的染色 *HeLa* 细胞的细胞质区域。我们继续将 *HeLa* 细胞在 TPE-PAA NP 中孵育一段时间后,仍能检测到较强的荧光信号,这表明 TPE-PAA NP 能较为稳定的存在与于细胞中。因此,接下来我们进一步研究 TPE-PAA NP 在细胞中的长期示踪能力和效果。以 24h 作为一个细胞传代周期,即过 24h 传代染色的细胞被定义为第 2 代,在 48h 后为第 3 代,在 72h 后为第 4 代,以此类推至第 9 代,每一代细胞均通过共聚焦显微镜检测每一代细胞内荧光强度情况。由图 8 可以观测到,经过长达 10 天时间染色后的 *Hela* 细胞,示踪至少 9 代后,依然具有良好的荧光成像效果。这一实验结果表明 TPE-PAA NP 能够有效示踪 *HeLa* 细胞增殖至少 9 代以上,有望作为一种活细胞荧光示踪探针材料。

3 结论

本研究首先通过 ATRP 活性聚合方法,成功合成一种新型的 pH 敏感响应型两亲性聚合物 TPE-PAA,然后通过在水中的自组装制备 AIE 型纳米微球 TPE-PAA NP。该纳米粒子平均粒径约为 200nm,具有优异的水溶性和 AIE 发光特性。此外,TPE-PAA NP 水溶液荧光强度随 pH 增大不断增强。因此,TPE-PAA NP 有望作为多响应智能荧光传感器材料。基于 TPE-PAA NP 优异的 AIE 发光特性和低细胞毒性,*HeLa* 细胞在 TPE-PAA NP 染色后可检测到强荧光信号,并且在有效示踪 *HeLa* 细胞增殖至 9 代以上时,依然展现出良好的荧光成像效果。因此,TPE-PAA NP 是一种良好的活细胞荧光示踪探针,在荧光传感、生物成像及临床生物医学材料研究等领域具有较大的应用前景。

参考文献:

- [1] Li H Y, Wang C F, Hou T, Li F. *Anal Chem*, 2017, 89(17): 9100~9107.
- [2] Wang X, Li P, Ding Q, Wu C C, Zhang W, Tang B. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(5): 2061~2068.
- [3] Meng F F, Wang J P, Ping Q N, Yeo Y. *ACS Nano*, 2018, 12(7): 6458~6468.
- [4] Wang D, Zhang T, Wu B, Ye C X, Wei Z Y, Cao Z Q, Wang G J. *Macromolecules*, 2019, 52(18): 7130~7136.
- [5] Jiang J Y, Qian Y Y, Xu Z H, Lv Z, Tao P, Xie M J, Liu S J, Hang W, Zhao Q. *Chem Sci*, 2019, 10: 5085~5094.
- [6] Mei J, Leung N L C, Kwok R T K, Lam J W Y, Tang B Z. *Chem Rev*, 2015, 115(21): 11718~11940.
- [7] Luo J D, Xie Z L, Lam J W Y, Cheng L, Chen H Y, Qiu C F, Kwok H S, Zhan X W, Liu Y Q, Zhu D B, Tang B Z. *Chem Commun*, 2001, (18): 1740~1741.
- [8] 程金华, 姜鸿基. *应用化学*, 2019, 36(4): 440~450.
- [9] 赵秋丽, 卞洁鹏, 杨庆浩, 后振中. *化工新型材料*, 2019, 47(7): 154~158.
- [10] Wang Y L, Liu H L, Chen Z, Pu S Z. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2021, 245: 118928.
- [11] Jiang G Y, Zhu W P, Chen Q Q, Shi A P, Wu Y Q, Zhang G X, Li X, Li Y D, Fan X L, Wang J G. *Analyst*, 2017, 142 (23): 4388~4392.
- [12] Tong H, Hong Y N, Dong Y Q, Häussler M, Li Z, Lam J W Y, Dong Y P, Sung H H Y, Williams I D, Tang B Z. *J Phys Chem B*, 2007, 111 (40): 11817~11823.
- [13] 张雨欣, 王基伟. *高分子通报*, 2021, (4): 1~6.
- [14] 罗海媛, 郑捷, 梁水妹, 刘聪, 石光, 李国明. *化工新型材料*, 2016, 44(10): 14~16.
- [15] Liao C W, Hsn Y C, Chu C C, Chang C H, Krucaite G, Volyniuk D, Grazulevicius J V, Grigalevicius S. *Org Electron*, 2019, 67: 279~286.
- [16] Guan X L, Wang L, Liu M N, Wang K L, Yang X Q, Ding Y Y, Tong J H, Lei Z Q, Lai S J. *Mater Chem Front*, 2021, 5: 355~367.
- [17] Jiang G Y, Zeng G J, Zhu W P, Li Y D, Dong X B, Zhang G X, Fan X L, Wang J G, Wu Y Q, Tang B Z. *Chem Commun*, 2017,

53 (32): 4505~4508.

- [18] Guan X L, Meng L, Jin Q J, Lu B C, Chen Y B, Li Z F, Wang L, Lai S J, Lei Z Q. *Macromol Mater Eng*, 2018, 303(6): 1700553~1700563.
- [19] Li K, Jiang Y H, Ding D, Zhang X H, Liu Y T, Hua J L, Feng S S, Lin B. *Chem Commun*, 2011, 47(26): 7323~7325.
- [20] 赵跃智, 蔡敏敏, 钱妍, 解令海, 黄维. *化学进展*, 2013, 25(3): 296~321.
- [21] 关晓琳, 李志飞, 王林, 刘美娜, 王凯龙, 杨学琴, 李亚丽, 胡丽丽, 赵小龙, 来守军. *化学学报*, 2019, 77(12): 1268~1278.

Preparation of the Polymer Nanoparticles with Aggregation-Induced Emission (AIE) and Its Cell Tracing Application

LAI Shou-jun^{1*}, ZHANG Wen-jing¹, TENG Si-hui¹, LI Qiao¹, YANG Xue-qin², GUAN Xiao-lin²

(1. *School of Chemical Engineering, Lanzhou University of Arts and Science, Lanzhou 730000, China*;

2. *Key Laboratory of Eco-Environment-Related Polymer Materials, Ministry of Education Key Laboratory of Polymer Materials Ministry of Gansu Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China*)

Abstract: In recent years, water-soluble aggregation-induced emission (AIE) polymer nanomaterials, as a new kind of intelligent materials, have great advantages in the fields of life science research because of their unique optical properties, environmental stimulus response and excellent biocompatibility. In this study, a new atom transfer radical polymerization (ATRP) initiator (TPE-BMP) with aggregation induced luminescence (AIE) properties was synthesized, and then the amphiphilic polymer TPE-PAA was successfully prepared by a method of ATRP active polymerization. Then, the pH responsive and AIE-active spherical nanoparticles TPE-PAA NP with a particle size of about 200nm were formed by a self-assembling process. The results show that TPE-PAA NP possesses excellent water solubility, good dispersion, dimensional stability and excellent AIE luminescence characteristics, and its solution fluorescence shows rapid sensitivity to environmental pH. More importantly, the fluorescent signals were significantly strong in *HeLa* cells after cells were incubated with TPE-PAA for 24h based on the characteristic of AIE fluorescence and low cytotoxicity. TPE-PAA NP could be internalized by the cancer cells and effectively track the *HeLa* cells for as long as 9 passages. So TPE-PAA NP was expected to be used as a fluorescent tracer probe material for living cells.

Key words: Tetraphenylethylene; Poly(acrylic acid); Aggregation-induced emission; Nanoparticles; Cell tracing