

含罗丹明 B 基团的聚天冬酰胺荧光成像探针研究

张 淼^a 刘 凡^{*,a} 柯希骏^a 陈 思^a 鄢国平^{*,a}
张 桥^a 梁淑彩^b 王玉芳^a 蒋 灿^a^(a) 武汉工程大学材料科学与工程学院 武汉 430205^(b) 武汉大学药学院 武汉 430072

摘要 以 *L*-天冬氨酸为原料, 在体积分数为 85% 的磷酸催化条件下采用热缩合方法合成了聚琥珀酰亚胺大分子, 用罗丹明 B 与乙二胺反应生成的罗丹明-乙二胺衍生物的氨基以及乙醇胺上的氨基对聚琥珀酰亚胺进行开环反应, 合成了含罗丹明 B 基团的聚天冬酰胺大分子. 通过溴化与亲核取代反应将磺胺嘧啶基团接枝于聚天冬酰胺大分子上, 从而制备具有肿瘤靶向功能的水溶性聚天冬酰胺大分子荧光探针(SD-PHEA-RhB). 对所合成的荧光探针进行了核磁共振谱、红外光谱、紫外-可见光谱、凝胶渗透色谱和质谱等结构表征, 进一步测试了其分子量及分布、粒径、荧光性能、体外细胞毒性与细胞摄取以及荧光成像性能. 实验结果表明, 所合成的聚天冬酰胺荧光成像探针具有良好的水溶性和荧光性能, 对酸性环境敏感, 对 HepG2 和 HeLa 细胞均具有较低的体外细胞毒性, 能被 HeLa 肿瘤细胞选择性摄取, 且能获得较好的 HeLa 细胞红色荧光成像.

关键词 荧光成像; 荧光探针; 肿瘤靶向; 聚天冬酰胺; 磺胺嘧啶; 罗丹明 B

Polyaspartamide Fluorescent Probe Containing Rhodamine B and Sulfadiazine Groups for Molecular Imaging and Diagnosis

Zhang, Miao^a Liu, Fan^{*,a} Ke, Xijun^a Chen, Si^a Yan, Guoping^{*,a}
Zhang, Qiao^a Liang, Shucui^b Wang, Yufang^a Jiang, Can^a^(a) School of Materials Science and Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205^(b) School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072

Abstract Polysuccinimide (PSI) was synthesized by thermal condensation of *L*-aspartic acid as raw materials and phosphoric acid (85% by volume) as catalyst. The water-soluble polyaspartamide fluorescent probes (SD-PHEA-RhB) was further synthesized by ring-opening reaction between PSI with the amino groups of ethanolamine and rhodamine B (RhB) modified by ethylenediamine, and then nucleophilic substitution reaction of sulfadiazine (SD). SD-PHEA-RhB was characterized by ¹H NMR, IR, UV, gel permeation chromatograph (GPC), mass spectrometry and so on. Its molecular weight and distribution, particle size, fluorescence properties, *in vitro* cell cytotoxicity, cellular uptake and fluorescent imaging assays were also measured. Experimental data showed that the fluorescent probe possessed good water solubility and high sensitive to the acidic conditions. Moreover, these fluorescent probes had low *in vitro* cytotoxicities to HepG2 and HeLa cells, high specific uptake and good red fluorescent imaging in HeLa tumor cells.

Keywords fluorescent imaging; fluorescent probe; tumor-targeting; polyaspartamide; sulfadiazine; Rhodamine B

癌症治愈的关键在于早发现、早诊断和早治疗. 近年来, 生物医学成像技术已逐渐成为肿瘤临床诊断的重

要技术手段之一^[1-6]. 其中活体动物荧光成像技术由于能观察动物体内的基因表达和细胞活动, 检测灵敏度

* Corresponding authors. E-mail: 5245934@163.com; guopyan2006@163.com

Received August 3, 2019; revised October 18, 2019; published online December 27, 2019.

Project supported by the National Key Research and Development Program (Nos. 2016YFB1101302, 2018YFB1105502), the Wuhan Yellow Crane Talents Program (No. [2017]1), the Scientific Research Projects for High Level Talents in the New Century (No. [2017]344), the South Hubei Talents Project of Innovation and Entrepreneurship (No. [2019]11) and the Scientific Research Fund Project of Wuhan Institute of Technology (No. K201861).

国家重点研发计划专项(Nos. 2016YFB1101302, 2018YFB1105502)、武汉市“黄鹤英才计划”(创新人才)项目(No. 武人才办[2017]1)、湖北省新世纪高层次人才工程人选科研项目(No. 鄂人社函[2017]344)、咸宁市“南鄂英才”及创新创业项目(No. 咸人组文[2019]11)、武汉工程大学科学基金(No. K201861)资助项目.

高,有望广泛用于人体多种疾病如肿瘤的临床检测与诊断。然而,在目前活体荧光成像的检测中,引入体内的荧光探针存在一系列如成像所需剂量过高、对人体毒副作用大、在体内代谢的速度快、利用率低、对肿瘤细胞缺乏选择性或靶向性及对肿瘤的成像效果较差等问题^[7-12]。

α,β -聚(2-羟乙基)-L-天冬酰胺(PHEA)具有水溶性好、毒性低、无免疫反应、易于化学修饰和在体内可降解且降解产物可被体内吸收等优点,已被广泛用作药物的载体和血浆扩展剂等^[13-15]。磺胺嘧啶(SD)对肿瘤具有较好的亲和性,可被肿瘤组织或细胞选择性摄取与富集,已被作为良好的肿瘤靶向基团用于各类抗癌药物与磁共振成像造影剂的研究^[16-19]。

本工作针对目前荧光探针的不足,设计合成水溶性肿瘤靶向大分子荧光探针。首先以 L-天冬氨酸为原料,磷酸催化条件下采用热缩合法合成出聚琥珀酰亚胺大分子,并将罗丹明 B^[20]与磺胺嘧啶基团分别键连在大分子侧链上,从而制备具有肿瘤靶向性的水溶性聚天冬酰胺大分子荧光探针(SD-PHEA-RhB) (Scheme 1)。对合成的大分子荧光探针进行核磁共振谱、红外光谱、紫外-可见光谱、凝胶渗透色谱和质谱等结构表征,进一步测试其分子量及分布、粒径、荧光性能、体外细胞毒性与细胞摄取,以及荧光成像等性能。

1 结果与讨论

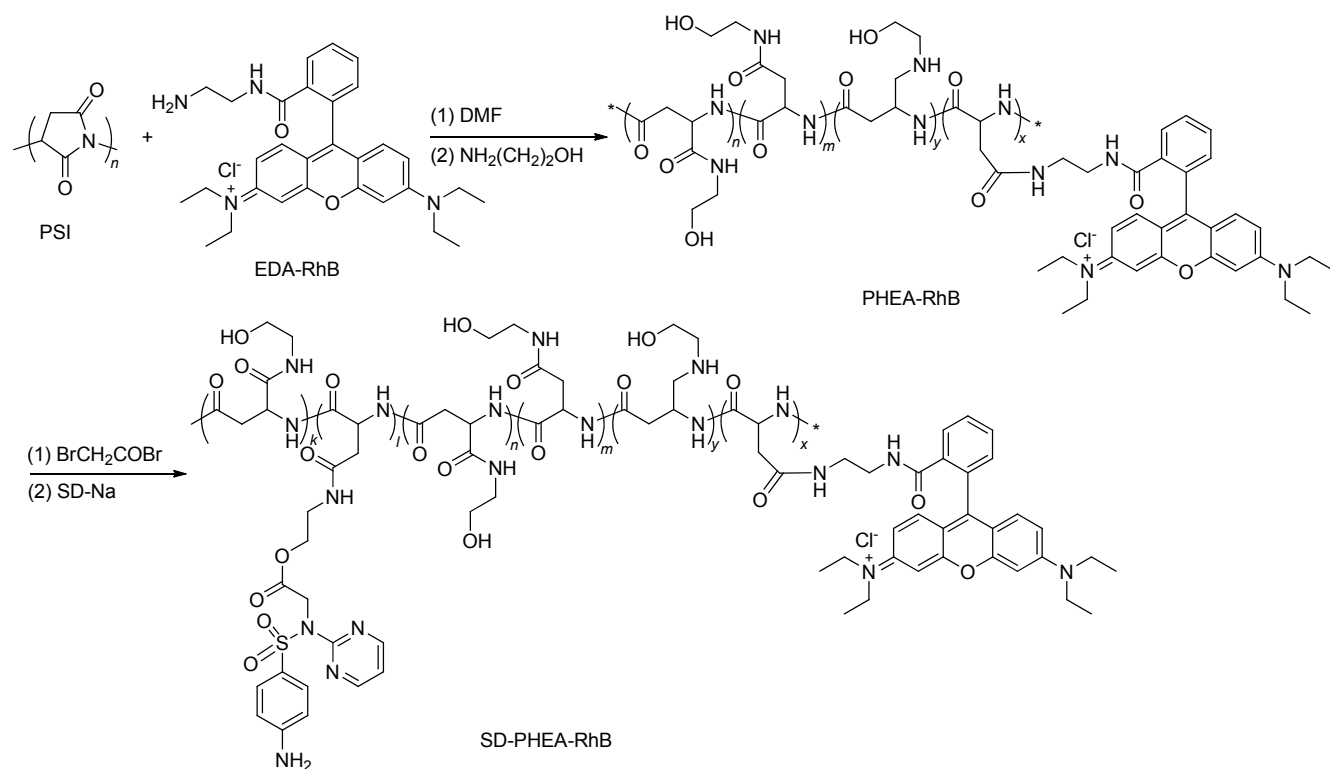
1.1 合成与结构表征

将罗丹明 B (RhB)与磺胺嘧啶(SD)分别键连在聚天冬酰胺大分子载体的侧链上,制备了聚天冬酰胺大分子荧光探针 SD-PHEA-RhB。由 EDA-RhB 的 ¹H NMR 图谱中 δ 6~9 内四个吸收峰的理论积分面积比为 6:1:2:1,而在 SD-PHEA-RhB 的 ¹H NMR 图谱中 δ 6.35 与 6.96 处吸收峰积分面积比为 6:1,故可推算出 δ 7.46 和 7.77 处的理论积分面积为 0.18 和 0.09,则与 SD-PHEA-RhB 的 ¹H NMR 图中实际积分面积的差值即为磺胺嘧啶基团的积分面积,可计算出 SD 在聚天冬酰胺大分子侧链上的摩尔接枝率为 4%,RhB 在聚天冬酰胺大分子侧链上的摩尔接枝率为 18.5%。

由凝胶渗透色谱(图 1)得 SD-PHEA-RhB 的 M_n 为 5800,其多分散系数为 2.63。

图 2 为 SD-PHEA-RhB 在酸性条件(pH=5)的紫外光谱图,从中可以看出有 RhB 的 565 nm 紫外吸收,表明成功将 RhB 接到聚天冬氨酸的侧链上,图 3 表明 SD-PHEA-RhB 在 565 nm 处的紫外吸收峰随着 pH 值减小而逐渐变强,这证明 SD-PHEA-RhB 在 565 nm 处对弱酸性环境具有敏感的特性。

对 pH 为 5,浓度为 0.05 mg/mL 的 SD-PHEA-RhB



图式 1 含罗丹明基团的聚天冬酰胺大分子 SD-PHEA-RhB 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route to polyaspartamide fluorescent probe (SD-PHEA-RhB)

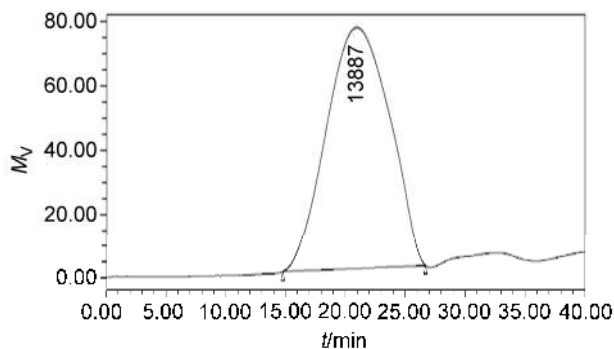


图 1 含罗丹明基团的聚天冬酰胺大分子 SD-PHEA-RhB 的 GPC 分子量曲线图

Figure 1 GPC of polyaspartamide fluorescent probe (SD-PHEA-RhB)

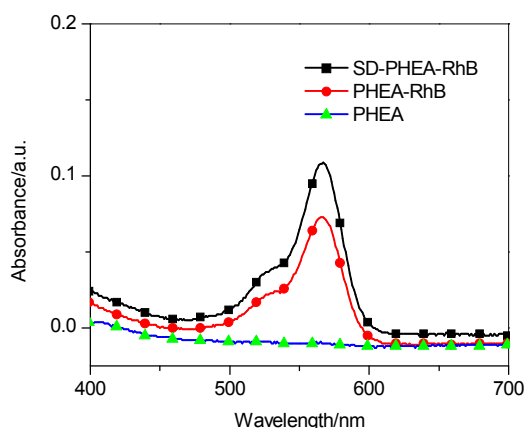


图 2 含罗丹明基团的聚天冬酰胺大分子 SD-PHEA-RhB 在酸性条件(pH=5)的紫外光谱图

Figure 2 UV spectra of SD-PHEA-RhB in the acidic condition (pH=5)

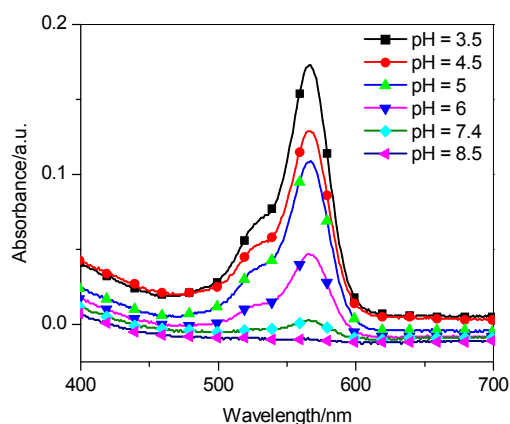


图 3 含罗丹明基团的聚天冬酰胺大分子 SD-PHEA-RhB 在不同 pH 条件下的紫外光谱图

Figure 3 UV spectra of SD-PHEA-RhB in the different acidic condition

水溶液进行了粒径分析(图4), 测得 SD-PHEA-RhB 平均粒径为 197 nm.

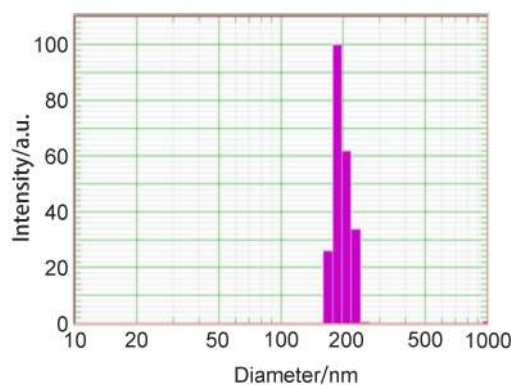


图 4 SD-PHEA-RhB 的粒径分布

Figure 4 Particle size distribution of SD-PHEA-RhB

1.2 荧光性能

在溶液 pH 为 5, 浓度为 0.05 mg/mL 时, 不同中间产物及 SD-PHEA-RhB 在波长为 565 nm 处激发的荧光发射光谱如图 5 所示, 可发现 PHEA-RhB 和 SD-PHEA-RhB 两种大分子在 588 nm 处产生荧光, 而 PSI 无荧光产生. 由于 RhB 具有 pH 敏感的特性, 而且合成的 SD-PHEA-RhB 荧光强度也显示其具有对 pH 敏感的特性. 在不同 pH 值条件下, SD-PHEA-RhB 的荧光激发光谱如图 6 所示. 随着溶液 pH 值减小, SD-PHEA-RhB 在 588 nm 处的荧光强度逐渐增大, 并在 pH 值为 2.5 时其荧光强度达到最大值; 在 pH 为 3.0~4.6 范围内时, 荧光强度变化较小. 这说明 SD-PHEA-RhB 在酸性条件可以激发出较强荧光.

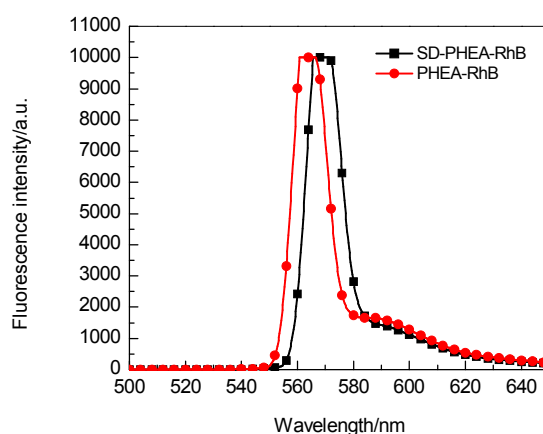


图 5 含罗丹明基团的聚天冬酰胺大分子 SD-PHEA-RhB 在酸性条件(pH=5)的荧光激发光谱

Figure 5 Fluorescence spectra of SD-PHEA-RhB in the acidic condition (pH=5)

当溶液浓度为 0.05 mg/mL 时, 对 SD-PHEA-RhB 在 588 nm 处的荧光强度随 pH 值变化的曲线采用 Hender-son-Hasselbach 方程(Eq. 1)进行曲线拟合:

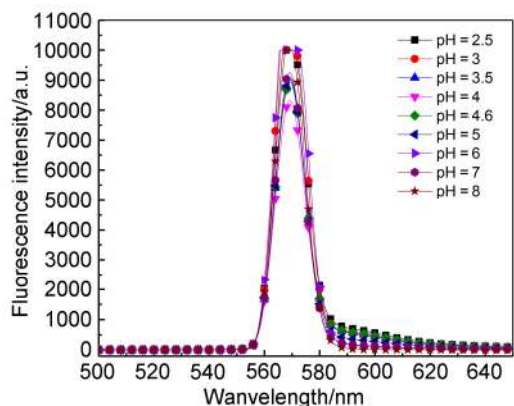


图6 含罗丹明基团的聚天冬酰胺大分子 SD-PHEA-RhB 在不同 pH 条件下的荧光激发光谱

Figure 6 Fluorescence spectra of SD-PHEA-RhB in the different acidic condition

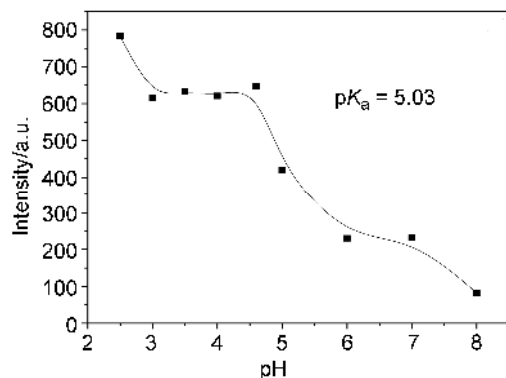


图7 含罗丹明基团的聚天冬酰胺大分子 SD-PHEA-RhB 在不同 pH 条件下的荧光强度的变化(激发波长: 588 nm)

Figure 7 Fluorescence intensity of SD-PHEA-RhB in the different acidic condition (emission wavelength: 588 nm)

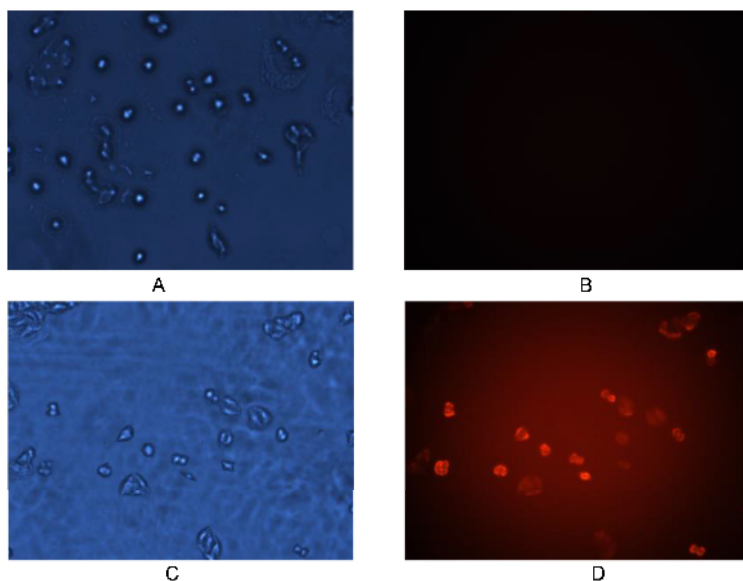


图9 含罗丹明基团的聚天冬酰胺大分子 SD-PHEA-RhB 的 HeLa 细胞体外荧光成像

Figure 9 *In vitro* fluorescence imaging of SD-PHEA-RhB in HeLa cells

(A) Control HeLa cells excited by white light; (B) control HeLa cells excited by green light; (C) HeLa cells incubated with SD-PHEA-RhB excited by white light; (D) HeLa cells incubated with SD-PHEA-RhB excited by green light

$$\lg[(F_{\max} - F)/(F - F_{\min})] = \text{p}K_{\text{a}} - \text{pH} \quad (1)$$

其中 F 代表的是固定波长下的荧光光强度, 而 F_{\max} 、 F_{\min} 分别为相应波长下的最大和最小荧光强度. 根据图 7 拟合曲线得到 SD-PHEA-RhB 的 $\text{p}K_{\text{a}}$ 为 5.03.

2.3 体外细胞毒性实验

采用噻唑蓝(MTT)法测试了 SD-PHEA-RhB 体外细胞毒性实验, 如图 8 所示. 实验结果表明 SD-PHEA-RhB 对 HepG2 肝癌细胞、HeLa 宫颈癌细胞具有较低的体外毒性. 在 SD-PHEA-RhB 浓度为 0.1 mg/mL 及更小浓度时, SD-PHEA-RhB 对 HepG2、HeLa 细胞的毒性较小, 而当浓度达到 0.25 mg/mL 及更大时, SD-PHEA-RhB 对 HepG2、HeLa 细胞的毒性略有增大.

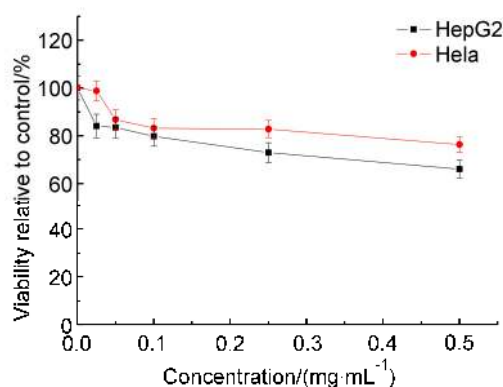


图8 SD-PHEA-RhB 的细胞毒性

Figure 8 Cell toxicity assay of SD-PHEA-RhB

2.4 体外细胞正常摄取与荧光成像试验

在 pH 为 5, SD-PHEA-RhB 浓度为 0.25 mg/mL 时,

加入 SD-PHEA-RhB 大分子荧光探针培养后的 HeLa 细胞在白光照射下无荧光(图 9, C), 而由于其最佳激发波长为 565 nm, 故当使用绿光进行激发时, 可以发现 SD-PHEA-RhB 大分子探针被 HeLa 细胞摄取进入细胞内, 并在 588 nm 激发出红色荧光(图 9, D), 从而可获得较好的 HeLa 细胞红色荧光成像. 相对应的未加入 SD-PHEA-RhB 大分子探针的空白细胞实验组, HeLa 细胞在白光和绿光的激发下都不会有荧光出现(图 9, A, B).

2 结论

以水溶性聚天冬酰胺为大分子载体, 以磺胺嘧啶为肿瘤靶向基团, 罗丹明 B 为荧光基团, 成功合成了聚天冬酰胺大分子荧光成像探针(SD-PHEA-RhB). 实验结果表明, 大分子荧光成像探针具有良好的水溶性、对酸性敏感的荧光特性和对 HepG2、HeLa 细胞较低的体外毒性, 该探针可被 HeLa 肿瘤细胞选择性摄取, 并获得较好的红色荧光成像, 有望成为一种性能良好的肿瘤靶向荧光探针, 并用于在细胞内的酸性细胞器(溶酶体等)的荧光检测.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Varian Mercury Vx-300 型核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司); Waters 凝胶渗透色谱仪(GPC, 美国 Waters 公司, 配备 2695D 分离组件, 标样为聚苯乙烯, 流动相为 DMF, 流速 1 mL/min, 柱温 35 °C); UNIC-2802H UV/Vis 紫外光谱仪(中国上海 UNIC 公司); F-4600 荧光分光光谱仪(日本高新技术公司); PSS NICOMP380 型粒径仪(美国 PSS 公司); Nicolet Impact 420 型傅立叶红外分析仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-AES, IRIS Intrepid II, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 细胞培养箱(CO₂ 体积分数为 5%, 37 °C, 饱和湿度, 美国 Thermo forma 公司); Benchmark Plus 酶标仪(日本 Bioid 公司); IX-70 荧光倒置显微镜(Olympus 株式会社); 有机元素分析仪(德国 Elementar Vario EL cube).

天冬氨酸、磷酸(85%)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、罗丹明 B、乙醇、乙二胺、二氯甲烷、无水硫酸钠、乙醇胺、乙醚、溴乙酰溴、吡啶、磺胺嘧啶、氢氧化钠、四丁基氢氧化铵(体积分数为 10%的水溶液)和噻唑蓝(MTT)均为分析纯试剂. DMF 和二氯甲烷使用之前经氯化钙除水重蒸, 吡啶使用之前用固体氢氧化钠除水重蒸, 乙醇使用之前用碘镁法除水, 乙醚使用前用钠丝除水重蒸. 胎牛血清、RPMI-1640 培养基和胰蛋白酶为生

化试剂. HepG2 肝癌细胞和 HeLa 宫颈癌细胞由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供. 聚琥珀酰亚胺(PSI)与磺胺嘧啶钠(SDNa)按文献[19]报道的方法制备.

3.2 聚天冬酰胺大分子荧光探针的合成

将 20 g 罗丹明 B (RhB, 0.0418 mol)溶于 30 mL 乙醇中, 滴加乙二胺(EDA, 3 mL, 0.045 mol), 回流(15 h)直到溶液失去红色, 蒸出溶剂, 再加入 30 mL 水, 用二氯甲烷(20 mL×3)萃取, 有机相用水洗两次, 用无水硫酸钠干燥, 蒸去溶剂, 真空干燥, 得 12.038 g 淡粉红色固体罗丹明 B-乙二胺(RhB-EDA), 产率为 60.19%. m.p. 214.9~218.2 °C(文献值^[21]: 217~219 °C); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₆) δ: 7.88 (s, 1H), 7.43 (d, *J*=3.1 Hz, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.48~6.17 (m, 6H), 3.40~3.09 (m, 10H), 2.41 (t, *J*=6.5 Hz, 2H), 1.56 (s, 2H), 1.14 (t, *J*=6.9 Hz, 12H); ESI-MS *m/z*: 486.29 (M+H⁺).

将 4.66 g 聚琥珀酰亚胺(PSI, 0.048 mol)溶于 50 mL DMF 中, 快速搅拌下加入 7 g RhB-EDA (0.014 mol)的 DMF 溶液, 于 70 °C 恒温反应 48 h 后, 停止加热, 冷却至室温. 浓缩溶液, 再将反应液在搅拌下倒入乙酸乙酯中, 析出棕黄色沉淀. 抽滤, 收集固体, 真空干燥, 得到 10.666 g 深红色固体, 产率为 91.47%.

将 9.52 g 所制得的深红色固体(0.0343 mol)溶于 20 mL DMF 中, 在冰浴冷却下快速搅拌, 慢慢滴加 1.68 g 乙醇胺(ETA, 0.0275 mol, 1.645 mL)的 DMF 溶液, 继续搅拌反应 12 h. 然后在搅拌下将反应液倒入无水乙醚中, 析出沉淀, 过滤. 将所得固体溶于二次蒸馏水, 用二次蒸馏水透析, 蒸干透析液, 得到 9.63 g 深红色固体 PHEA-RhB, 产率为 86%. m.p. 295.8~299.2 °C; UV (H₂O) λ_{max}: 588 nm; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.76 (s, 3H), 7.44 (s, 4H), 7.02~6.84 (m, 5H), 6.33 (s, 6H), 4.62 (s, 1H), 3.07 (s, 2H), 1.02 (s, 12H); IR (KBr) ν_{max}: 3450 (OH), 3008, 2930 (CH, CH₂), 1725, 1664 (COO), 1615, 1515 (C—N), 1357 (S=O), 1231, 1018 (COOC), 915, 695, 668 (C₆H₄) cm⁻¹.

将 2.0 g PHEA-RhB 溶于 20 mL DMF 中, 室温搅拌下加入摩尔分数为 10%的溴乙酰溴(0.168 g, 8×10⁻⁴ mol, 0.073 mL)以及 0.672 mL 吡啶, 反应 48 h. 用薄层色谱(TLC)检测反应, 反应完成后, 减压蒸除吡啶, 制得溴代 PHEA-RhB 大分子. 将溴代大分子溶于 30 mL DMF 中, 加入占大分子单元摩尔分数 10%的磺胺嘧啶钠(0.227 g, 8×10⁻⁴ mol)与体积分数为 10%的四丁基氢氧化铵(1.94 mL, 8×10⁻³ mol), 室温下反应 3 d. 反应完后用无水乙醚沉淀, 抽滤, 得到淡黄色粉末. 将产物溶于二次蒸馏水, 透析 36 h 后, 透析液有少量沉淀析出, 将透析液旋干, 真空干燥, 得到 1.88 g 棕黄色固体聚天冬

酰胺大分子荧光探针 SD-PHEA-RhB, 产率为 82%. m.p. 216.4~230.8 °C; UV (H₂O) λ_{\max} : 267, 565 nm; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.77 (s, 3H), 7.46 (s, 4H), 6.95 (s, 5H), 6.35 (s, 6H), 4.52 (s, 1H), 3.11 (d, *J*=11.4 Hz, 2H), 1.55 (s, 1H), 1.29 (dd, *J*=14.4, 7.2 Hz, 2H), 1.05 (s, 8H), 0.92 (t, *J*=7.3 Hz, 1H); IR (KBr) ν_{\max} : 3450 (OH), 3008, 2930 (CH, CH₂), 1725, 1640 (COO), 1545 (C—N), 1329 (S=O), 1231, 1018 (COOC), 915, 695, 668 (C₆H₄) cm⁻¹. Anal. calcd for C₂₅₅H₃₅₃O₉₄N₅₈S₁Cl₂ C 52.81, H 6.13, N 14.01, O 25.93, S 0.22; found C 52.70, H 6.10, N 14.01, O 25.91, S 0.23.

3.3 体外细胞毒性实验

取 HepG2 肝癌细胞、HeLa 宫颈癌细胞分别用新鲜培养基配成细胞悬浮液, 按每孔 5×10^3 个细胞分别接种于 96 孔板中, 培养过夜贴壁后, 去掉培养液, 每孔分别加入 200 μ L 含 SD-PHEA-RhB 浓度为 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 和 0.5 mg/mL 的新鲜培养液. 每个浓度设置 5 个复孔, 对照组加入等量的培养液. 置于 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养 16 h, 加入 MTT (5 mg/mL, 每孔 20 μ L) 溶液继续培养 4 h, 倒掉培养液, 每孔加 200 μ L DMSO, 常温下震荡 10 min 后测量在 490 nm 时各孔的吸光度值, 计算细胞相对存活率.

3.4 体外细胞正常摄取与荧光成像试验

取处于对数生长期的 HeLa 细胞, 用含双抗及体积分数为 10% 的胎牛血清的 RPMI-1640 培养基调节细胞悬浮液浓度为 5×10^4 个/mL, 按每孔 1×10^5 接种于 24 孔板, 每个细胞系设置 5 个复孔. 过夜贴壁之后, 去掉培养液, 每孔加入 200 μ L 浓度为 0.25 mg/mL 的 SD-PHEA-RhB 磷酸缓冲盐溶液 (pH 为 4.6), 置于 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养 1 h 后, 吸出培养液并用 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次, 每次 2~3 min, 然后用 0.5 mL 的体积分数为 4% 的多聚甲醛 (固定液) 进行固定, 固定时间约 10 min. 最后在 IX-70 荧光倒置显微镜下进行观察拍摄.

辅助材料 (Supporting Information) RhB-EDA 的核磁

共振谱图以及 SD-PHEA-RhB 的核磁共振和红外光谱. 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>) 上下载.

References

- [1] Gao, H.; Zheng, X.; Qi, Y.; Wang, S.; Wan, C. P.; Rao, G. X.; Mao, Z. W. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 648 (in Chinese). (高慧, 郑喜, 祁燕, 王斯, 万春平, 饶高雄, 毛泽伟, 有机化学, **2018**, *38*, 648.)
- [2] Feng, T.; Xue, Z. B.; Yin, J. J.; Jiang, X.; Feng, Y. Q.; Meng, S. X. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, *39*, 1891 (in Chinese). (冯彤, 薛中博, 尹娟娟, 蒋旭, 冯亚青, 孟舒献, 有机化学, **2019**, *39*, 1891.)
- [3] Zhao, J.; Jin, G. R.; Weng, G. J.; Li, J. J.; Zhu, J.; Zhao, J. W. *Drug Discovery Today* **2017**, *22*, 1367.
- [4] Liu, F.; Zou, T. J.; Tan, Z. L.; Chen, S.; Wu, Z. H.; Yan, G. P.; Zhang, Q.; Liang, S. C.; Yang, J. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1245.
- [5] Liao, X. Y.; Liang, S. C.; Liu, Y. P.; Zhang, J. Y.; Yan, G. P. *Chin. J. Anal. Chem.* **2017**, *45*, 747.
- [6] Liang, S. C.; Liu, Y. M.; Fu, T.; Yang, F.; Chen, X. H.; Yan, G. P. *Colloid Surf., B* **2016**, *148*, 293.
- [7] Liu, F.; Zou, T. J.; Tan, Z. L.; Yan, G. P.; Guo, J. F.; Zhang, Q.; Liu, H.; Yang, J. *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.* **2016**, *24*, 500.
- [8] Qin, Z. T.; Hall, D. J.; Liss, M. A.; Hoh, C. K.; Kane, C. J.; Wallace, A. M.; Verab, D. R. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, 101315-1.
- [9] Wu, Y.; Cai, W. B.; Chen, X. Y. *Mol. Imaging Biol.* **2006**, *8*, 226.
- [10] Hollis, C. P.; Weiss, H. L.; Evers, B. M.; Gemeinhart, R. A.; Li, T. L. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 1450.
- [11] Waschkau, B.; Faust, A.; Schäfers, M.; Bremer, C. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 1.
- [12] Yan, G. P.; Liu, F.; Ai, C. W.; Zou, T. J.; Li, L.; Guo, Q. Z.; Yu, X. H.; Li, Q. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2012**, *27*, 405.
- [13] Yan, G. P.; Ai, C. W.; Zong, R. F.; Liu, F. *Chin. Sci. Bull.* **2010**, *55*, 3085.
- [14] Liang, S. C.; Chen, X. H.; Liu, Y. B.; Qin, M.; Yan, G. P. *Chin. J. Anal. Chem.* **2014**, *42*, 648.
- [15] Liang, S. C.; Liu, Y. B.; Xiang, J.; Qin, M.; Yu, H.; Yan, G. P. *Colloids Surf., B* **2014**, *116*, 206.
- [16] Yan, G. P.; Li, Z.; Xu, W.; Zhang, Q.; Li, L.; Liu, F.; Han, L.; Ge, Y. X.; Guo, J. F. *Int. J. Pharm.* **2011**, *407*, 119.
- [17] Li, Q.; Han, L.; Yan, G. P.; Tu, Y. Y.; Yuan, H.; Zou, T. J.; Shao, C. T.; Liu, H. F. *Acta Polym. Sin.* **2014**, *2*, 263.
- [18] Yan, G. P.; Zong, R. F.; Li, L.; Fu, T.; Liu, F.; Yu, X. H. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2743.
- [19] Huang, J. L.; Wang, H. Y.; Zhou, C. L. *J. Appl. Polym. Sci.* **1995**, *58*, 11.
- [20] Wysockia, L. M.; Lavis, L. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 752.
- [21] Soh, J. H.; Swamy, K. M. K.; Kim, S. K.; Kim, S.; Lee, S. H.; Yoon, J. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5966.

(Zhao, C.)