

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.15.003

pH 敏感纳米粒的制备和功能表征 *

杨思聪 刘海军 董 霄 陆 琴 方 超^Δ

(上海交通大学医学院药理学教研室 上海 200025)

摘要 目的:制备具有 pH 响应的甲氧基聚乙二醇甲基丙烯酸-2- 六亚甲基亚胺乙酯聚合物,测试材料 pH 功能响应,以及建立聚合物纳米粒载药方法。**方法:**通过核磁共振氢谱鉴定 ATRP(Atom Transfer Radical Polymerization)聚合反应所获得的化合物结构。滴加-搅拌挥发法制备聚乙二醇甲基丙烯酸-2- 六亚甲基亚胺乙酯纳米粒,酶标仪测定其载药量和包封率。透射电镜下观察其形态,激光粒度仪分析测定其粒径,包载 DiR 红外荧光探针检测纳米粒 pH 响应功能。**结果:**分别成功合成得到 2- 溴代异丁酸聚乙二醇单甲醚和甲基丙烯酸-2- 六亚甲基亚胺乙酯单体。通过 ATRP 聚合反应成功合成聚乙二醇甲基丙烯酸-2- 六亚甲基亚胺乙酯聚合物材料,并通过核磁共振对聚合材料进行鉴定。通过滴加搅拌法制备包载有模型药物香豆素-6 的纳米粒,并对纳米粒的形态表征及载药量进行测定。**结论:**试验结果表明制备得到的聚合物纳米粒尺寸均匀,具有预期的 pH 响应效果,可以装载模型药物。

关键词: ATRP 聚合反应; pH 响应; 纳米粒; 荧光探针

中图分类号: R730; R943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)15-2808-05

Synthesis and Characterization of pH Sensitive Nanoparticles*

YANG Si-cong, LIU Hai-jun, DONG Xiao, LU Qin, FANG Chao^Δ

(Department of Pharmacology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: Prepare pH sensitive PEG-C7AMA polymer material. Test polymer nanoparticle pH functional property and establish drug loading method. **Methods:** The ¹H NMR is used to detect the polymer materials obtained from ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization) polymerization reaction. Use Drop-stir evaporation method to prepare PEG-C7AMA nanoparticle and microplate reader to detect nanoparticle drug loading and entrapping efficiency. Use TEM (Transmission Electron Microscope) & DLS (dynamic light scattering) to observe and analyze nanoparticle shape respectively. Polymer nanoparticle load DiR fluorescence probe is used to detect pH functional property with microplate reader. **Results:** Success to synthesis PEG macroinitiator and 2-azepane ethyl methacrylate respectively, which have been detected by ¹H NMR spectrum. Success to synthesis PEG-C7AMA polymer material through ATRP polymerization reaction and ¹H NMR to detect polymer materials. Through solvent-evaporation method to prepare nanoparticle which have been loaded coumarin-6, as a model drug, and to detect drug loading, entrapping efficiency and the shape of the established nanoparticle. **Conclusion:** Through experimental results show that the size of nanoparticle is on average. Nanoparticle have anticipated pH functional effect and can load model drug.

Key words: ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization); pH responsive; Nanoparticle; Fluorescence probe

Chinese Library Classification(CLC): R730; R943 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)15-2808-05

前言

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的重大疾病,WHO 最新发布的《世界癌症报告 2014》显示,近年来全球癌症新增病例和死亡人数出现惊人增长^[1],探索新的抗肿瘤治疗的策略是当今生命科学研究领域的热点。

众所周知,纳米材料是当今时代兴起的一项热点技术,其特点是材料尺寸在 1-100 nm 之内。而肿瘤药物与使用纳米材料进行联合使用则是一个非常具有前景的研究热点。肿瘤纳米药物具有自身独特的材料特性,颗粒直径极小、低毒性以及靶部位纳米蓄积能力强等特点,之前的研究主要在于纳米粒表面

修饰有细胞特异性配体或靶头来介导细胞内吞的药物递送设计^[2-6]。目前肿瘤纳米给药递送平台则更多是利用肿瘤微环境特点响应来实现更为有效递送药物目的。肿瘤微环境的特征大致可以归纳为以下几点:酶响应^[7]、酸响应^[8,9]、氧化还原响应^[10,11]。

研究是通过一种新型酸响应递送载体,在实现纳米药物递送的同时利用材料自身能够在肿瘤间质中超敏释放药物从而达到治疗肿瘤的目的。通过 ATRP 聚合反应,制备得到具有在 pH 6.8 条件下能够实现功能化响应的聚合物纳米粒,分别通过包载香豆素-6、DiR 荧光探针来实现其模型药物的载药量测定和酸敏感功能响应的检测。其材料自身还可以结合并被运用于新的层与层自组装型纳米药物递送载体中^[12,13]。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272569)

作者简介:杨思聪(1988-),硕士,电话:021-63846590-778013, E-mail: yangsicong10@sjtu.edu.cn

^Δ 通讯作者:方超,教授,博士生导师,主要研究方向:肿瘤靶向治疗纳米技术, E-mail: fangchao32@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2016-12-13 接受日期:2017-01-10)

1 材料与方法

1.1 实验试剂与药品

无水硫酸钠、三乙胺、中性氧化铝、2,2'-联二吡啶、无水甲醇、磷钨酸、2-溴代异丁酰溴购自阿拉丁试剂公司,聚乙二醇单甲醚(Mw:5000)、乙腈、香豆素-6、溴化亚铜购自美国Sigma-Aldrich公司,N-(2-羟乙基)六亚甲二胺;DiR购自Thermo Fisher公司,对二苯酚、甲基丙烯酸酐、氘代氯仿购自百灵威化学试剂公司,甲苯、二氯甲烷、盐酸、氯化钠、四氢呋喃、碱性氧化铝购自国药化学试剂公司,G-50葡聚糖凝胶购自美国GE公司。

1.2 实验仪器

IKA-Rtc basic 温控加热搅拌器购自德国IKA公司,R-200旋转蒸发仪购自瑞士Buchi公司,RLPHR 2-4 LD 冷冻干燥机购自Marin Christ公司,XS205型电子天平购自Mettler Toledo公司,酶标仪购自Thermo Fisher公司,Bruker AVANCE III HD 400 MHz 核磁共振仪购自美国布鲁克仪器有限公司,Malvern Zetasizer Nano ZS 激光粒度仪购自英国Malvern公司。

1.3 聚合物合成、载药量及 pH 功能响应测试方法

1.3.1 溴代聚乙二醇引发剂的合成 与之前文献报道的方法类似^[14],大致步骤如下:称取8 g 聚乙二醇单甲醚(1.0 e.q)置于已干燥的圆底烧瓶中,加入无水甲苯,在40℃的条件下与聚乙二醇单甲醚混合搅拌至完全溶解。通过减压旋转蒸发的方式移除甲苯溶剂及聚乙二醇单甲醚中的水分。

称取除水后5 g的聚乙二醇单甲醚并加入适量无水四氢呋喃中,40℃温和加热直至澄清溶液,随后向反应瓶中加入1.4 mL 三乙胺(10.0 e.q)。将反应瓶置于冰上,搅拌15分钟,然后使用一次性注射器逐滴加入0.49 mL的2-溴代异丁酰溴(4 e.q),加入试剂后在混合反应体系里很快有沉淀生成,在氩气保护条件下室温持续搅拌反应48小时后停止反应,产物应变为棕色。减压除去反应溶剂,直至获得棕色油状液体。

将反应物溶于二氯甲烷中并转移至分液漏斗。首先使用10%盐酸溶液将溶解有产物的二氯甲烷溶液萃洗,收集二氯甲烷溶液并用1N 氢氧化钠溶液洗涤,最后用盐水洗涤二氯甲烷溶液。加入适量无水硫酸钠干燥二氯甲烷溶液,随后收集溶液并转移至烧瓶中减压干燥去除二氯甲烷溶剂。

加入2.5 mL 二氯甲烷将棕色油状物溶解。使用玻璃胶头滴管,在搅拌条件下将二氯甲烷溶液逐滴加入1 L 冷甲基叔丁基醚中,立即有沉淀析出。4℃搅拌洗涤沉淀,真空抽滤收集粉末沉淀,将粉末在真空烘箱内室温干燥过夜,收集干燥完毕的终产物。

1.3.2 甲基丙烯酸-2-六亚甲基亚胺乙酯合成 在之前报道的文献基础上进行实验^[15,16],步骤大致如下,在三颈瓶中首先将14.3 g(0.1 e.q)N-(2-羟乙基)六亚甲二胺、10.1 g(0.1 e.q)三乙胺以及0.11 g(0.001 e.q)对二苯酚阻聚剂溶解于100 mL 无水四氢呋喃中。随后在冰浴条件下逐滴加入10.4 g(0.1 e.q)甲基丙烯酸酐。反应体系回流2小时,随后滤除体系中三乙胺盐酸盐,减压旋蒸除去溶剂四氢呋喃,剩余残留液体即为粗产物。将粗产物通过减压蒸馏后即可得到高纯度甲基丙烯酸-2-六亚甲基亚胺乙酯为无色透明液体。

1.3.3 ATRP 聚合反应 通过多篇相关文献参考并结合实际

试验结果^[17-19],大致实验步骤如下,首先称取0.5 g(0.1 e.q)2-溴代异丁酸聚乙二醇单甲醚放入Schlenk瓶中。随后在橡胶塞密封的条件下向Schlenk瓶中加入6 mL 无水四氢呋喃,加热搅拌直至2-溴代异丁酸聚乙二醇单甲醚在四氢呋喃中溶解。将反应溶液冷却至室温。向瓶中加入42.6 mg 2,2'-联二吡啶(0.273 e.q)并使用微量移液器加入1.01 g(5 e.q)甲基丙烯酸-2-六亚甲基亚胺乙酯单体。将Schlenk瓶浸入液氮中进行冷冻脱气,共冷冻-脱气循环三次,最后在氩气保护条件下快速加入14 mg(0.1 e.q)溴化亚铜,反应瓶体系抽真空后移入油浴中,加热搅拌反应10小时。

反应结束后先将反应混合体系快速降至室温,加入甲醇/四氢呋喃(1/4;v/v)混合溶液,除去反应体系中铜盐活性,如有必要可以置于水浴中超声以获得澄清溶液。通过中性氧化铝柱来滤除溶液体系中铜盐,洗脱液为四氢呋喃,收集过柱洗脱溶液并减压旋蒸,最后得到棕黄色或淡黄色油状液体。将油状聚合物溶液移入截断分子质量为10 kDa的透析袋中,放置在超纯水中透析3天,一日换水三次。透析结束后,透析袋后的聚合物溶液使用0.2 μm 醋酸纤维素膜过滤,冻干收集产物,冻干产物为白色至淡黄色粉末。

1.3.4 纳米粒构建及表征 本试验通过测定形态、粒径(粒径分布)、Zeta 电位以及包封率和载药量对纳米粒PEG-C7AMA进行表征。纳米粒经由磷钨酸复染后通过TEM观察形态。纳米粒加水分散并稀释至适当的浓度后使用激光粒度仪测定粒径(粒径分布)和Zeta 电位。

(1) 纳米粒的构建:采用滴加-搅拌挥发法制备载有香豆素-6的纳米粒^[20,21],步骤如下:精密称取30 mg 甲氧基聚乙二醇甲基丙烯酸-2-六亚甲基亚胺乙酯和250 ng 香豆素-6,加入1 mL 四氢呋喃溶解,使用微量移液器在搅拌条件下逐滴加入3 mL 纯水中,搅拌子转速为1500 rpm。室温条件下,搅拌挥发3小时,随后将溶液转移至圆底烧瓶中,旋转蒸发30分钟除去溶液中残余的有机溶剂,即可得到载药纳米粒溶液。将纳米粒溶液通过预先使用2× PBS (pH 7.4)平衡完毕的G-50脱盐柱除去未包载入纳米粒的游离药物,收集所有滤出的纳米粒溶液并超滤浓缩,即得最终纳米溶液。

(2) 纳米粒的表征:通过激光粒度仪检测纳米粒溶液中纳米粒子粒径大小及Zeta 电位。将前述方法制备得到的纳米粒溶液稀释后滴加于铜网上,使用磷钨酸复染铜网样品,通过TEM对PEG-C7AMA纳米粒进行观察。

1.3.5 包封率和载药量测定 称取6 mg 香豆素-6溶解于乙腈溶液中,制备得到香豆素-6储备液。精密量取一定量的储备液并稀释至以下浓度:100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL、400 ng/mL、500 ng/mL、600 ng/mL、800 ng/mL,制作定量用荧光标准曲线。

移取适量包载有香豆素-6的纳米粒溶液冷冻干燥12小时,称取适量冻干纳米粒样品,加入1 mL 乙腈溶液破坏纳米粒,移取200 μL 乙腈溶液通过酶标仪进行荧光定量分析(Ex: 460 nm; Em: 510 nm)。将得到荧光吸收值带入标曲方程,计算得到纳米粒中包载有的香豆素-6含量,通过下列公式计算得到载药量和包封率。

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{包封于纳米粒中香豆素-6}}{\text{总香豆素-6投料量}} \times 100\%$$

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{包封于纳米粒中香豆素-6}}{\text{载香豆素-6纳米粒的总质量}} \times 100\%$$

1.3.6 pH 功能响应测试 采用滴加-搅拌挥发法制备载有 DiR 荧光探针的纳米粒,步骤如下:精密称取 30 mg 甲氧基聚乙二醇甲基丙烯酸-2- 六亚甲基亚胺乙酯和 200 ng DiR 荧光探针,加入 1 mL 四氢呋喃溶解,使用微量移液器在搅拌条件下逐滴加入 3 mL 纯水中,搅拌子转速为 1500 rpm。室温条件下,搅拌挥发 3 小时,随后将溶液转移至圆底烧瓶中,旋转蒸发 30 分钟除去溶液中残余的有机溶剂,即可得到载药纳米粒溶液。将纳米粒溶液通过预先使用 2× PBS (pH 7.4)平衡完毕的 G-50 脱盐柱除去未包载入纳米粒的游离药物,收集所有滤出的纳米粒溶液并超滤浓缩,即得最终纳米溶液。

分别精密移取 5 份 20 μL 纳米粒溶液至 96 孔板中,随后加入 180 μL 的 pH 值分别为 7.4、7.0、6.8、6.7、6.4、6.0 的 PBS 溶液,通过酶标仪及荧光检测仪检测不同 pH 条件下的纳米粒荧光信号。

1.4 数据分析方法

将所有的原始数据输入 GraphPad Prism 6 软件中,以浓度或溶液酸碱度值为横坐标,测量值为纵坐标通过软件自动拟合的方式得到相关载药量标准曲线和纳米粒 pH 敏感功能响应曲线图。

2 结果

2.1 溴代聚乙二醇引发剂

核磁共振氢谱检测产物,产物纯度为 98%,预计产率 70%-90%。

化合物中各氢原子的化学位移值: ^1H NMR 400MHz (TMS, CDCl_3 , ppm): 4.30(m,4H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}$), 3.40-3.83 (m,452H, $-\text{CH}_2-$), 3.38 (s,3H, $-\text{O}-\text{CH}_3$), 1.92(s,6H, $-\text{C}-\text{CH}_3$)。

2.2 甲基丙烯酸-2- 六亚甲基二胺乙酯

核磁共振氢谱检测产物,产物纯度 98%,预计产率 40%-50%。

化合物中各氢原子的化学位移值: ^1H NMR 400MHz (TMS, CDCl_3 , ppm): 6.09 (brs, ^1H , $\text{CHH}=\text{C}(\text{CH}_3)-$), 5.55 (brs, ^1H , $\text{CHH}=\text{C}(\text{CH}_3)-$), 4.24 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$), 2.84 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$), 2.72 (m,4H, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-$), 1.94 (s, 3H, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)$), 1.63 (m, 4H, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-$), 1.58 (m, 4H, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-$)。

2.3 ATRP 聚合反应产物

核磁氢谱检测聚合物材料产物,预计产率 60%。

化合物中各氢原子的化学位移值: ^1H NMR 400MHz

(TMS, CDCl_3 , ppm): 4.30 ((m,4H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}$) (2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$), 3.40-3.83 (m,676H, $-\text{CH}_2-$), 3.38 (s,3H, $-\text{O}-\text{CH}_3$), 2.84 (t, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$), 2.72 (m,4H, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-$), 1.80 (s,6H, $-\text{C}-\text{CH}_3$), 1.65 (s,2H, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-$)1.63-1.58 (m, 8H, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-$), 0.8-1.20 (m, 3H, $\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2$)。

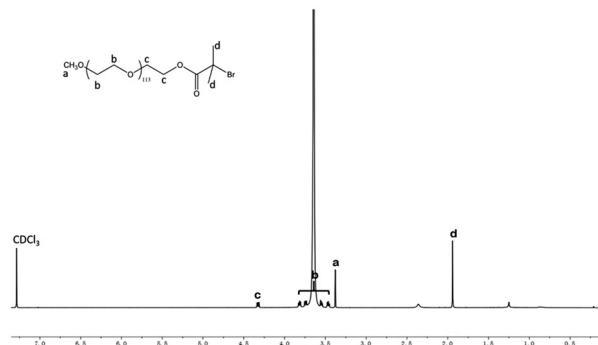


图 1 2- 溴代异丁酸聚乙二醇单甲醚酯核磁氢谱图

Fig.1 ^1H NMR spectrum of PEG macroinitiator

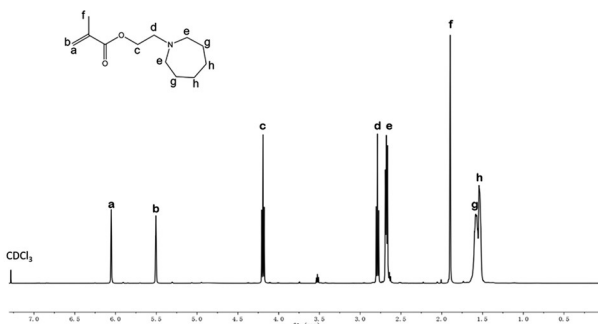


图 2 甲基丙烯酸-2- 六亚甲基亚胺乙酯核磁氢谱图

Fig.2 ^1H NMR spectrum of 2-azepane ethyl methacrylate

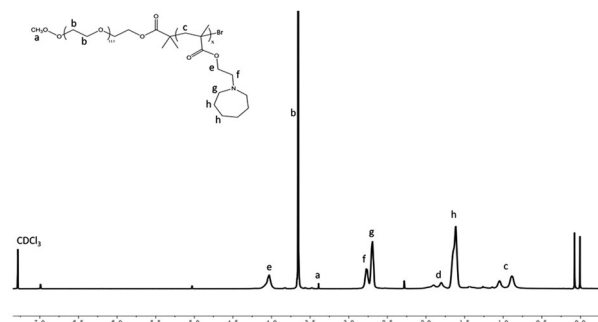


图 3 $\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-\text{C7AMA}$ 核磁氢谱图

Fig.3 ^1H NMR spectrum of $\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-\text{C7AMA}$

2.4 纳米粒的构建及表征

通过前述方法制备得到的纳米粒溶液的粒径大小、Zeta 电位及透射电镜图分别如下表和图所示。

表 1 纳米粒 DLS 检测的粒径及 Zeta 电位数据

Table 1 The DLS size and Zeta potential data of nanoparticles

	Particle size(d. nm)	Zeta potential(mV)
	纳米粒粒径	表面电位
纳米粒样品(Nanoparticles)	24.1 $\pm$ 0.3	-0.7 $\pm$ 1.1

2.5 载药量及包封率

精密称取冻干后包载有香豆素-6 的纳米粒 0.49 mg,溶解

于 1 mL 乙腈溶液中并涡旋混匀,移取 200 μL 样品溶液置于 96 孔板中,通过 Ex: 460 nm 波长激发,Em: 510 nm 波长收集吸

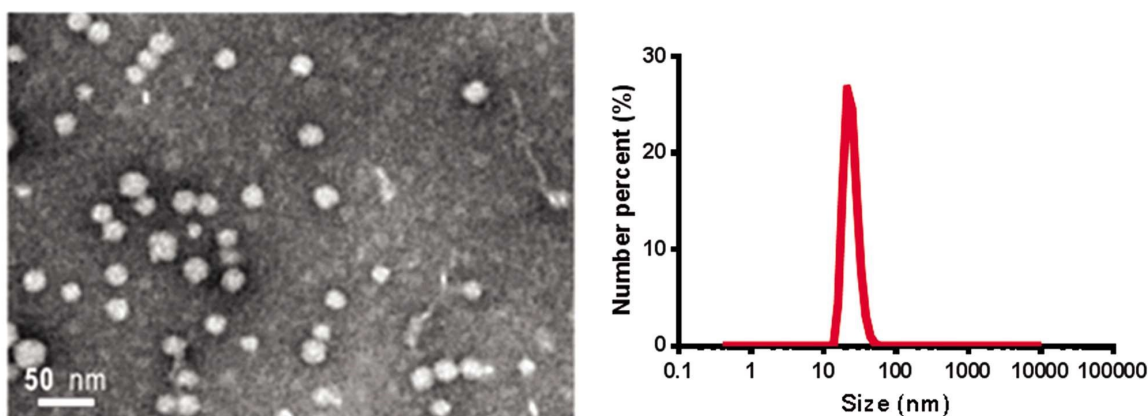


图4 左图为 pH7.4 条件下纳米粒磷钨酸复染透射电镜图,右图为纳米粒激光粒度仪的粒径分布图

Fig.4 Left one is transmission electron micrographs of nanoparticles which have been stained by phosphotungstic acid solution at pH 7.4. Right one is the graph about nanoparticle size which is distributed in solution

收值。测得样品荧光吸收值为 8908.77, 带入已经测得的香豆素-6 染料标准曲线 $y = 26.13x + 3614.9$, $R^2 = 0.9719$ 中, 计算得到此质量的纳米粒载有香豆素-6 的含量为 202.6 ng, 载药量为 0.042%, 包封率为 81.04%。

2.6 纳米粒 pH 功能响应测试

装载近红外荧光探针 DiR 的纳米粒分散在不同 pH (7.4、7.0、6.8、6.7、6.4、6.0) 环境的 PBS 溶液中, 各取 200 μ L 置于 96 孔板中, 观察其在 700 nm 处的荧光图像。由于 DiR 染料不溶于水, 纳米粒在 pH 6.8 环境下崩解后, 荧光信号消失, 并且使用酶标仪对不同 pH 溶液中的纳米粒荧光信号进行半定量分析。将得到的原始光强度值信号数据输入 GraphPad Prism 6 软件中, 以溶液酸碱度值为横坐标荧光信号强度为纵坐标, 通过软件自动拟合的方式来绘制出不同 pH 条件下纳米粒荧光信号变化曲线, 以此来量化表示材料的酸敏感特征响应功能。

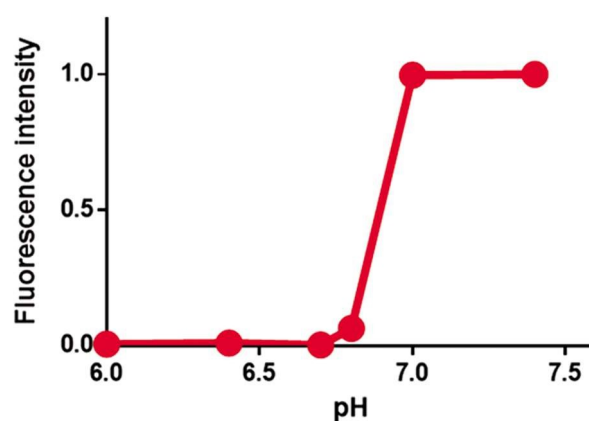


图5 不同 pH 条件下纳米粒溶液 DiR 荧光信号的半定量分析

Fig.5 DiR fluorescence quantitative analysis for nanoparticle in different pH PBS solution

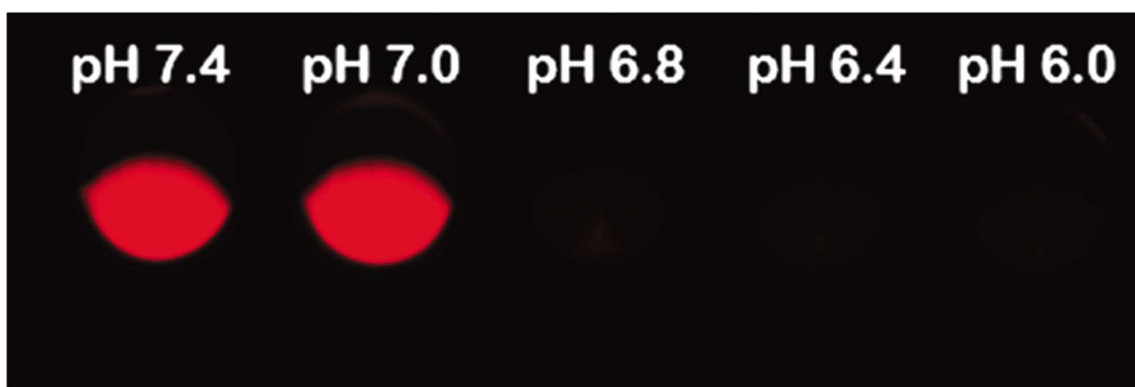


图6 纳米粒溶液在 700 nm 处 DiR 荧光信号图像

Fig.6 DiR fluorescence image for nanoparticle in different pH PBS solution

3 讨论

肿瘤微环境一直作为肿瘤纳米药物递送的一个热点研究方向, 目前大多数 pH 敏感纳米药物载体一般是设计为细胞内溶酶体酸响应型^[22,23], 但是能够实现在肿瘤间质弱酸性环境中快速响应释放药物的材料则非常的少。因此本载体设计的纳米药物具有较大的开创性, 能够为一些体内细胞外给药作用提供有效载体。本试验以较为简便的方式成功合成了溴代聚乙二醇单甲醚大分子引发剂、甲基丙烯酸-2- 六亚甲基二胺乙酯单体,

并在此基础上选用合成工艺成熟的 ATRP 反应来制备聚合物, 此反应能够制备得到较复杂聚合物以及 PDI(Polymer dispersity index, 聚合物分散性指数)值分布较小的聚合物^[24,25]。最终成功合成了具有 pH 响应功能的 PEG-C7AMA 聚合物材料。期间通过核磁共振氢谱的检测手段来鉴定化合物的结构。

在成功制备得到相关聚合物材料后, 将得到聚合材料溶解于四氢呋喃溶液中并选用能够得到粒径分布较好的搅拌滴加法来制备纳米粒溶液, 最终通过动态光散射仪以及透射电镜的手段证明在溶液体系中分布均匀的纳米粒自身也呈现均一球

型形态,同时也确证了我们制备纳米粒的方式是正确且可靠的。

通过测量纳米粒装载疏水荧光探针信号的试验成功检测了聚合材料所具有的 pH 功能响应特性。从结果可知纳米粒的酸敏感响应值为 pH6.8, 即当纳米粒的外部环境酸度值达到 pH6.8 后便可以使得纳米粒崩解并释放出里面包载的药物。通过现象观察可知在包载有荧光探针的纳米粒溶液中加入酸溶液可以迅速的猝灭荧光信号,这表明此纳米材料除酸度值响应外还具有崩解迅速的特点。随后还将疏水性的香豆素-6 作为模型药物装载入纳米粒中,通过包封率和载药量的测定,试验结果中较高的包封率确证了此纳米粒可以有效装载疏水药物。综上所述,本文成功合成了 pH 敏感材料且制备出了响应纳米粒,通过滴加-搅拌挥发方法制备的纳米粒具有明显的核壳结构,大小均匀,形态圆整,并建立了纳米粒的质量控制方法。进一步测试其功能响应并将模型药物装载入纳米粒中,为进一步研究纳米粒运用于肿瘤微环境的药物递送提供了实验基础。因为其非常灵敏的酸敏感变化,目前已经了解到此材料被运用于动物体内肿瘤成像实验^[26],其作为 pH 荧光探针的高灵敏度已经得到相关实验的确证,但是其载药实验还未能够被完全运用,其自身的材料特点可以使其被用于装载某些需要短时间内在局部组织内大量蓄积才能起效的药物。综上所述,此纳米材料还可以拓展运用至其它需要酸敏感检测的实验研究中,其材料自身具有广泛的应用前景。

参考文献(References)

- [1] Bernard WS, Christopher PW. World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization
- [2] Zhan H, Jagtiani T, Liang JF. Enhanced anticancer activity of drug nanoparticles formulated with β -cyclodextrin [J]. *Anticancer Drugs*, 2016[Epub ahead of print]
- [3] Liu YR, Guan YY, Luan X, et al. Delta-like ligand 4-targeted nanomedicine for antiangiogenic cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2015, 42: 161-171
- [4] Yu DH, Liu YR, Luan X, et al. IF7-Conjugated Nanoparticles Target Annexin 1 of Tumor Vasculature against P-gp Mediated Multidrug Resistance[J]. *Bioconjug Chem*, 2015, 26(8): 1702-1712
- [5] Yu DH, Lu Q, Xie J, et al. Peptide-conjugated biodegradable nanoparticles as a carrier to target paclitaxel to tumor neovasculature[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(8): 2278-2292
- [6] Yu DH, Ban FQ, Zhao M, et al. The use of nanoparticulate delivery systems in metronomic chemotherapy[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(16): 3925-3937
- [7] Liu J, Zhang B, Luo Z, et al. Enzyme responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted tumor therapy in vitro and in vivo [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(8): 3614-3626
- [8] Yang XZ, Du JZ, Dou S, et al. Sheddable ternary nanoparticles for tumor acidity-targeted siRNA delivery [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(1): 771-781
- [9] Biabanikhankahdani R, Alitheen NB, Ho KL, et al. pH-responsive Virus-like Nanoparticles with Enhanced Tumour-targeting Ligands for Cancer Drug Delivery[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37891
- [10] Yin T, Liu J, Zhao Z, et al. Smart nanoparticles with a detachable outer shell for maximized synergistic antitumor efficacy of therapeutics with varying physicochemical properties [J]. *J Control Release*, 2016, 243: 54-68
- [11] Chen Q, Feng L, Liu J, et al. Intelligent Albumin-MnO₂ Nanoparticles as pH-/H₂O₂ -Responsive Dissociable Nanocarriers to Modulate Tumor Hypoxia for Effective Combination Therapy [J]. *Adv Mater*, 2016, 28(33): 7129-7136
- [12] Suh MS, Shen J, Kuhn LT, et al. Layer-by-layer nanoparticle platform for cancer active targeting[J]. *Int J Pharm*. 2016, 517(1-2): 58-66
- [13] Li HJ, Du JZ, Liu J, et al. Smart Superstructures with Ultrahigh pH-Sensitivity for Targeting Acidic Tumor Microenvironment: Instantaneous Size Switching and Improved Tumor Penetration[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(7): 6753-6761
- [14] Bayó-Puxan N, Dufresne MH, Felber AE, et al. Preparation of polyion complex micelles from poly(ethylene glycol)-block-polyions [J]. *J Control Release*, 2011, 156(2): 118-127
- [15] Zhou K, Wang Y, Huang X, et al. Tunable, ultrasensitive pH-responsive nanoparticles targeting specific endocytic organelles in living cells[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50(27): 6109-6114
- [16] Yu DY, Luo CH, Fu WX, et al. New thermal-responsive polymers based on alanine and (meth)acryl amides [J]. *Polym Chem*, 2014, 5(15): 4561-4568
- [17] Xing YH, Lin SL, He XH, et al. Synthesis, self-assembly and responsive properties of PEG-b-PDMAEMA-b-PMMAzo triblock copolymer[J]. *Chinese Journal of Polymer Science*, 2013, Issue (5): 833-840
- [18] Tan BH, Hussain H, Liu Y, et al. Synthesis and self-assembly of brush-type poly [poly (ethylene glycol)methyl ether methacrylate] -block-poly (pentafluorostyrene) amphiphilic diblock copolymers in aqueous solution[J]. *Langmuir*, 2010, 26(4): 2361-2368
- [19] Fujii S, Cai Y, Weaver JV, et al. Syntheses of shell cross-linked micelles using acidic ABC triblock copolymers and their application as pH-responsive particulate emulsifiers [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(20): 7304-7305
- [20] Forrest ML, Won CY, Malick AW, et al. In vitro release of the mTOR inhibitor rapamycin from poly(ethylene glycol)-b-poly(epsilon-caprolactone) micelles[J]. *J Control Release*, 2006, 110(2): 370-377
- [21] Jette KK, Law D, Schmitt EA, et al. Preparation and drug loading of poly (ethylene glycol)-block-poly (epsilon-caprolactone) micelles through the evaporation of a cosolvent azeotrope [J]. *Pharm Res*, 2004, 21(7): 1184-1191
- [22] Liu J, Li Q, Zhang J, et al. Safe and Effective Reversal of Cancer Multidrug Resistance Using Sericin-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles for Lysosome-Targeting Delivery in Mice [J]. *Small*, 2016[Epub ahead of print]
- [23] Li T, Amari T, Semba K, et al. Construction and evaluation of pH-sensitive immunoliposomes for enhanced delivery of anticancer drug to ErbB2 over-expressing breast cancer cells [J]. *Nanomedicine*, 2016[Epub ahead of print]
- [24] Joubert F, Musa OM, Hodgson DR, et al. The preparation of graft copolymers of cellulose and cellulose derivatives using ATRP under homogeneous reaction conditions [J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43(20): 7217-7235
- [25] Kowalewski T, McCullough RD, Matyjaszewski K. Complex nanostructured materials from segmented copolymers prepared by ATRP [J]. *Eur Phys J E Soft Matter*, 2003, (1): 5-16
- [26] Wang Y, Zhou K, Huang G, et al. A nanoparticle-based strategy for the imaging of a broad range of tumours by nonlinear amplification of microenvironment signals[J]. *Nat Mater*, 2014 (2): 204-212