高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

基于铁掺杂红色碳点和滚环扩增技术构建的靶向药物递送DNA纳米组装体

宁　淦，庄晶云，张如燕，丁可欣，周　亭，
王秀凤，王　芳，张志庆
（中国石油大学(华东)化学化工学院，青岛 266580）

摘要　以滚环扩增(RCA)产生的长单链脱氧核糖核酸(DNA)为支架，开发了一种基于RCA的组装技术. 将该支架与具有不同功能的短链组装成多价适配体，再与铁掺杂的红色碳点(Fe-CDs)结合，构建了多价适配体核酸组装体-Fe-CDs-阿霉素(AFD)纳米平台，用于精准的联合癌症治疗. 在AFD纳米平台中，MUC1适配体能够发挥高效的靶向能力，在精准作用于癌细胞的同时减少对正常细胞的伤害. Fe-CDs具有类过氧化物酶活性，可将过氧化氢催化分解为羟基自由基，从而实现化学动力学治疗. 此外，AFD通过其中丰富的CG碱基对能够高效负载阿霉素(DOX). 当多价适配体凭借高效的靶向性进入癌细胞后，会释放负载的Fe-CDs和DOX，实现对癌细胞的有效杀灭.

关键词　滚环扩增；碳点；多价适配体；药物递送；癌症治疗
中图分类号　O648　　**文献标志码**　A　　doi：10.7503/cjcu20260027

Iron-doped Red Carbon Dot and Rolling Circle Amplification-mediated DNA Nano-assemblies for Targeted Drug Delivery

NING Gan, ZHUANG Jingyun, ZHANG Ruyan, DING Kexin,
ZHOU Ting, WANG Xiufeng, WANG Fang, ZHANG Zhiqing*
(*College of Chemistry and Chemical Engineering*,
China University of Petroleum(*East China*), *Qingdao* 266580, *China*)

Abstract　A rolling circle amplification (RCA)-based assembly technique was proposed, which utilized the long single-stranded DNA produced by RCA as a scaffold. This scaffold was assembled with functional short strands into multivalent aptamers and subsequently combined with iron-doped red carbon dots (Fe-CDs) to construct a multivalent aptamer-based nanoplatform, termed assembly-Fe-CDs-doxorubicin (AFD), for precision combination cancer therapy. In the AFD nanoplatform, the MUC1 aptamer exerted efficient targeting capabilities, precisely acting on cancer cells while minimizing collateral damage to normal cells. The Fe-CDs possessed peroxidase-like activity, which catalyzed the decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2) into hydroxyl radicals (·OH), thereby achieving chemodynamic therapy (CDT). Furthermore, the abundant CG base pairs within the AFD structure enabled the high-

收稿日期：2026-01-12. 网络首发日期：2026-04-01.
联系人简介：张志庆，男，博士，教授，主要从事纳米分子工程和胶体与界面化学方面的研究. E-mail：zhangzq@upc.edu.cn
基金项目：山东省自然科学基金(批准号：ZR2022MB148，ZR2023MB148)和山东省优质教育教学资源项目(批准号：SDYAL2024044)和中国石油大学(华东)教改项目(批准号：YJG2023023)资助.
Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province, China(Nos. ZR2022MB148, ZR2023MB148), the Graduate Education Reform Project of Shandong province, China(Nos.SDYAL2024044), and the Graduate Education Reform Project of China University of Petroleum (East China), China(No.YJG2023023).

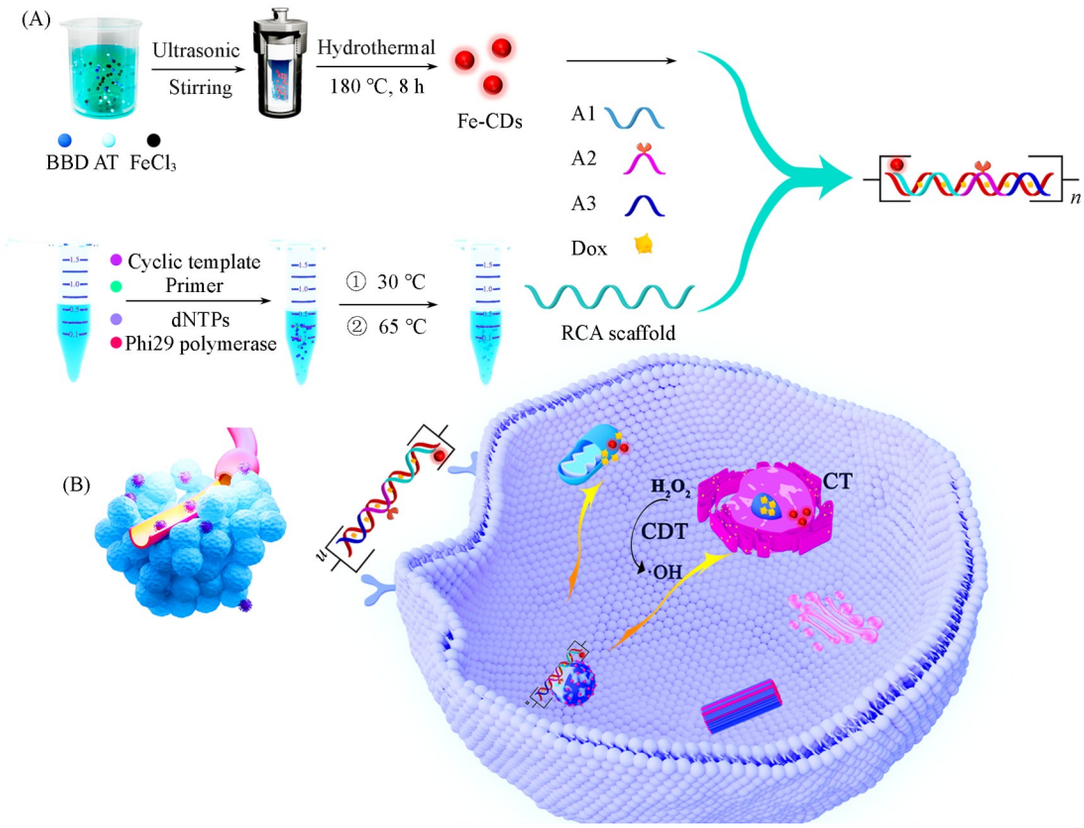
efficiency loading of doxorubicin (DOX). Upon entering cancer cells *via* highly efficient targeting, the multivalent aptamers released the encapsulated Fe-CDs and DOX, facilitating the effective eradication of cancer cells. In summary, this multivalent aptamer nanoplatform based on DNA and Fe-CDs provided a promising and highly selective approach for enhancing the efficacy of cancer treatment.

Keywords Rolling circle amplification; Carbon dot; Polyvalent aptamer; Drug delivery; Cancer therapy

癌症是严重威胁人类健康的主要疾病之一，每年致使数百万人死亡，已成为全球范围内的重大公共卫生问题[1]. 早期诊断与高效治疗对减轻疾病负担至关重要，但传统的化疗和手术等手段已难以满足当前对治疗精度与有效性的高要求[2,3]. 纳米技术的分子级精准诊疗为攻克该难题提供了新路径. 特别是化学动力学治疗(CDT)，因其无创、高特异性及不受限于缺氧环境和外源刺激的优势，已成为当前的研究热点[4~6]. 肿瘤代谢异常、氧化还原稳态失衡、肿瘤微环境呈弱酸性且过氧化氢(H_2O_2)浓度较高，为基于芬顿反应的CDT提供了适宜条件. 用于CDT的材料众多，包括金属有机框架材料(MOFs)[7]、半导体纳米材料[8]、贵金属纳米材料[9]和碳基纳米材料[5]等. 在各类纳米材料中，碳点(CDs)因具有可定制的荧光特性、优异的生物相容性、低毒性、良好的生理稳定性、高膜渗透性、超高的比表面积及表面功能化能力，在CDT治疗肿瘤方面具有广泛的应用前景[10~12]. 因此，基于CDs的诊断方法和治疗药物被视为减轻患者负担的有前景的策略.

近年来，脱氧核糖核酸(DNA)凭借其高生物相容性、可编程性及强大的功能模块集成能力，成为癌症诊疗领域极具潜力的新兴生物材料. 一方面，DNA可通过精心设计碱基序列，整合不同的功能模块；另一方面，它还能充当药物载体，例如化疗药物阿霉素(DOX)可嵌入DNA的双螺旋结构，实现药物递送. 此外，DNA的化学结构使其能够与其它功能材料相结合，从而引入额外的功能[13~16]. Gao等[17]将细胞靶向适配体修饰的金纳米棒(AuNR)与DNA带捆绑在一起，构建了可重构纳米簇炸弹，用于开展多模式精准癌症治疗. 该方法不仅能完全抑制肿瘤生长，而且不会产生脱靶毒性. Sun等[18]开发了一种DNA酶-MnO_2纳米系统. 其响应肿瘤微环境释放的Mn^{2+}不仅能催化类芬顿反应进行CDT，还能作为辅因子激活DNA酶发挥基因治疗作用，实现了优异的协同抗肿瘤效果. 此外，滚环扩增(RCA)技术因能够高效生成单链多功能RCA产物，在生物医学等领域得到了广泛应用并备受关注[19~21]. 通过合理设计环状模板链，RCA产物可被整合入多价适配体序列，从而实现对癌细胞的高效靶向，有效解决目前纳米材料靶向性不足的问题[22,23]. 相比单价适配体，多价适配体凭借多价效应展现出显著优势，其多点协同结合特性极大降低了解离速率并实现了亲合力的质的飞跃，同时其较大的分子结构有效克服了在体内被快速清除的缺陷，不仅延长了循环半衰期，更显著增强了肿瘤靶向与滞留效应[22~26]. 因此，利用CDs和RCA技术构建纳米组装体是一个具有广阔前景的研究方向.

本研究提出了一种基于铁掺杂碳点(Fe-CDs)和RCA技术的多价适配体核酸组装体-Fe-CDs-阿霉素(AFD)纳米平台，以实现癌症的联合治疗. 如Scheme 1所示，首先通过水热法合成Fe-CDs并利用一锅法制备长单链RCA支架. 该长单链RCA支架可与不同的互补短链进行自组装，形成多价适配体. 其中，Fe-CDs能够通过磷酰胺化反应与A1链偶联. 值得注意的是，Fe-CDs具有类过氧化物酶活性，可用于实现化学动力学治疗，同时它还具备荧光功能，可作为靶向荧光基团. 化疗药物DOX可通过CG碱基对嵌入DNA双螺旋结构. 此外，A2链为MUC1适配体，能够特异性识别癌细胞表面过表达的MUC1膜蛋白，A3链为互补链. AFD纳米平台可通过受体介导的内吞作用进入癌细胞. 进入细胞后，细胞内的DNA酶会对AFD进行分解代谢，使其释放出DOX和Fe-CDs，DOX抑制癌细胞的DNA合成，并协同Fe-CDs的CDT诱导癌细胞凋亡. AFD纳米平台优势显著，它不仅能够实现精确的靶向荧光成像，还具备较好的载药能力. 通过结合多种治疗方法，AFD纳米平台能够显著增强癌症治疗效果，在生物医学领域展现出巨大的应用潜力，有望为癌症的治疗提供思路.



Scheme 1 Schematic diagram of the preparation of polyvalent aptamer AFD(A) and the mechanism of killing cancer cells(B)

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

4-溴-1,2-苯二胺(BBD)、对氨基乙酰苯胺(AT)、三氯化铁($FeCl_3$)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、1-甲基咪唑、3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(TMB)、2′,7′-二氯二氢荧光素二醋酸酯(DCFH-DA)和4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES),分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;10×Phi29 DNA聚合酶缓冲液,上海碧云天生物技术有限公司;2×TE-Mg^{2+}缓冲液、乙酸钠缓冲液和磷酸盐缓冲液(PBS),北京索莱宝科技有限公司;L929和MCF-7细胞,北京北纳创联生物技术研究院;胎牛血清(FBS)、培养基(RPMI-1640)和青霉素-链霉素溶液,美国Gibco公司.本实验所用的DNA链购自南京金斯瑞生物科技有限公司,DNA序列如表1所示.

Table 1 DNA sequences employed in this work*

DNA	Sequence(5′→3′)
Circular template	TGTCTTCGCCTTCTTGTTTCCTTTCCTTGAAACTTCTTCCTTTCTTTCTTTCGACTAAGCACC
Circular primer	GGCGAAGACAGGTGCTTAGTC
63base	GGTGCTTAGTCGAAAGAAAGAAAGGAAGAAGTTTCAAGGAAAGGAAACAAGAAGGCGAAGACA
A1	PO_4-TCTTTCTTTCGACTAAGCACC
A2	**TTGCAGTTGATCCTTTGGATACCCTGG**TTTTTTTCCTTGAAACTTCTTCCTT
A3	TGTCTTCGCCTTCTTGTTTCC

* The sequences marked in bold is the MUC1 aptamer.

JEM-1400Plus和JEM-2100(UHR)型透射电子显微镜(TEM),日本JEOL公司;Nicolet iS50型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR),美国Thermo Fisher公司;U-3900H型紫外-可见分光光度计(UV-Vis)和F-7100型荧光光谱仪,日本Hitachi公司;ZetaPals型Zeta电位分析仪,美国Brookhaven公司;IX73型倒置荧光显微镜,日本Olympus公司.

1.2 实验过程

1.2.1 Fe-CDs和R-CDs的合成 参照文献[27]方法并稍加修改合成Fe-CDs. 将0.2 g BBD、0.16 g AT和0.035 g $FeCl_3$溶于20 mL水中，超声溶解后转移到反应釜中，于180 ℃下加热8 h. 待反应体系冷却后，将原液离心、过滤，并使用透析袋透析24 h. 最后通过冷冻干燥工艺进行干燥得到Fe-CDs粉末. R-CDs的制备除不添加$FeCl_3$外，其余步骤与Fe-CDs一致.

1.2.2 环状模板链的合成 将100 μmol/L线性模板、10 U/μL T4 PNK、1 mmol/L ATP及缓冲液混合，于37 ℃孵育30 min，于90 ℃灭活5 min；加入100 μmol/L引物，于95 ℃静置10 min后缓慢冷却至室温，静置3 h；加入350 U/μL T4 DNA连接酶及10×缓冲液，于16 ℃过夜，并于65 ℃灭活10 min；加入5 U/μL Exo I、200 U/μL Exo III及缓冲液，于37 ℃消化3 h，于80 ℃灭活；最后对环形模板进行乙醇沉淀，于−20 ℃保存.

1.2.3 RCA产物的合成 参照文献[21]方法合成RCA产物. 配制20 μL反应体系(含引物、环形模板、10×缓冲液和dNTPs各2 μL，Phi29聚合酶0.5 μL，去离子水11.5 μL). 混匀离心后置于PCR仪中于30 ℃孵育25 min后，于65 ℃灭活，于25 ℃冷却，即得到产物. 对得到的RCA产物进行琼脂糖凝胶电泳分析，并用凝胶成像仪进行成像.

1.2.4 不同组装体的构建 单价适配体组装体的制备与表征：取5 μL浓度为0.2 μmol/L的63碱基序列，先后与3种不同短链(浓度均为0.2 μmol/L，体积均为5 μL)混合，加入5 μL水，再添加25 μL 2×的TE-Mg^{2+}缓冲液，充分混匀，使总体积达到50 μL. 将混合液于95 ℃下孵育5 min，随后以1 ℃/min的速率降温至25 ℃，得到单价适配体组装体. 最后，采用琼脂糖凝胶电泳对其进行表征.

MF的制备：参照文献[28]的方法进行单价适配体组装体与Fe-CDs的偶联. 取10 μL单价适配体组装体(30 nmol/L)与10 μL EDC(10 mmol/L)及10 μL 1-甲基咪唑水溶液(20 mmol/L)在pH=6条件下混合，于37 ℃孵育90 min以充分活化. 随后，向体系中加入10 μL 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)(0.2 mol/L，pH=8)调节微环境，并加入10 μL Fe-CDs溶液(1 mg/mL)，在55 ℃下反应数小时. 反应结束后，通过透析纯化.

多价适配体组装体的制备与表征：取5 μL浓度为0.2 μmol/L的RCA产物，依次加入3种不同短链(浓度均为0.2 μmol/L，体积均为5 μL)混合，加入5 μL水，再添加25 μL 2×的TE-Mg^{2+}缓冲液，混合均匀，使总体积达到50 μL. 将混合液于95 ℃下孵育5 min，随后以1 ℃/min的速率降温至25 ℃，得到组装体(Assembly). 最后，通过琼脂糖凝胶电泳对得到的Assembly进行表征. 若要进行不同浓度的优化，只需改变短链的浓度即可.

AF的制备：上述制备得到的Assembly同样采用EDC介导的偶联策略. 将10 μL Assembly溶液、10 μL EDC(10 mmol/L)与10 μL 1-甲基咪唑水溶液(20 mmol/L)在pH=6条件下混合，于37 ℃孵育90 min. 活化完成后，加入10 μL HEPES缓冲液(0.2 mol/L，pH=8)和10 μL Fe-CDs溶液，于55 ℃反应数小时，最终产物经透析纯化，备用.

AD的制备：将Assembly与DOX按照摩尔比为1∶200在37 ℃下孵育30 min，即得到AD.

AFD的制备：将AF与DOX按照摩尔比为1∶200在37 ℃下孵育30 min，即得到AFD.

1.2.5 Fe-CDs类过氧化物酶活性分析 在评估Fe-CDs的类过氧化物酶活性时，将50 μg/mL的Fe-CDs、300 μmol/L的H_2O_2与64 mmol/L的TMB混合于0.1 mol/L、pH=4.5的乙酸钠缓冲液中. 孵育5 min后，测定其在652 nm处的吸光度. 其余相关材料的类过氧化物酶活性均参照此流程进行测试.

1.2.6 癌细胞靶向分析 将L929和MCF-7细胞分别与Fe-CDs、MF或AF共孵育30 min. 随后，利用Hoechst 33258染核并进行倒置荧光显微镜成像观察. 同时，在相同孵育条件下将平行组细胞消化收集，利用流式细胞术定量检测胞内荧光强度，以系统评估材料的内化水平.

1.2.7 细胞内活性氧(ROS)水平分析 利用2′,7′-二氯二氢荧光素二醋酸酯(DCFH-DA)检测细胞内活性氧水平. 首先，将L929细胞和MCF-7细胞接种到玻底培养皿中，培养24 h. 接着，向各个玻底培养皿中分别加入不同材料，让材料与细胞继续共同培养30 min. 之后，添加25 μmol/L的DCFH-DA，继

续培养15 min. 培养结束后，用磷酸盐缓冲液(PBS)对细胞洗涤3次，最后使用倒置荧光显微镜对细胞进行拍照记录.

1.2.8 细胞毒性测试 采用CCK-8法评估游离DOX及各纳米材料(Fe-CDs、AF和AFD)对L929和MCF-7细胞的毒性. 将细胞按1×10⁴个/孔的密度接种于96孔板中并培养24 h. 在单纯DOX毒性实验中，加入不同浓度DOX共孵育24 h后检测细胞活力. 在各材料的毒性评价中，加入相应材料孵育4 h后更换新鲜培养基，继续培养24 h再测定细胞存活率.

1.2.9 活死染色测试 将MCF-7细胞以1×10⁴个/孔的密度接种到96孔板中. 待细胞贴壁后，分别把细胞与Fe-CDs、DOX、AF和AFD共同孵育4 h. 孵育结束后，弃去含药培养基，更换成新鲜培养基，继续孵育24 h. 之后，用钙黄绿素(AM)/碘化丙啶(PI)对细胞进行染色，染色完成后，将细胞置于倒置荧光显微镜下进行观察.

1.2.10 细胞迁移实验 将MCF-细胞以1×10⁴个/孔的密度接种于96孔板中，待细胞长满单层后，分别加入Fe-CDs、DOX、AF和AFD共孵育4 h. 随后用10 μL枪头作出划痕，用PBS清洗3次后换用无血清培养基继续培养，并于不同时间拍照记录细胞的迁移情况.

2 结果与讨论

2.1 Fe-CDs和组装体的表征

利用透射电子显微镜(TEM)对R-CDs和Fe-CDs的形态进行了表征. R-CDs的TEM照片显示，其呈近球形，平均粒径为(2.89±0.02) nm[图1(A)和(C)]. Fe掺杂的Fe-CDs平均粒径略大于R-CDs，为(4.48±0.07) nm[图1(B)和(D)]. 此外，高分辨率透射电子显微镜(HRTEM)分析[图1(B)插图]证实了存在晶格间距为0.21 nm的有序晶格[29]. 在光谱特性方面，R-CDs在用波长560 nm的光激发时，最大发射波长约为655 nm[图2(A)]. Fe掺杂后，Fe-CDs的发射峰几乎没有变化[图2(B)]. 在紫外-可见吸

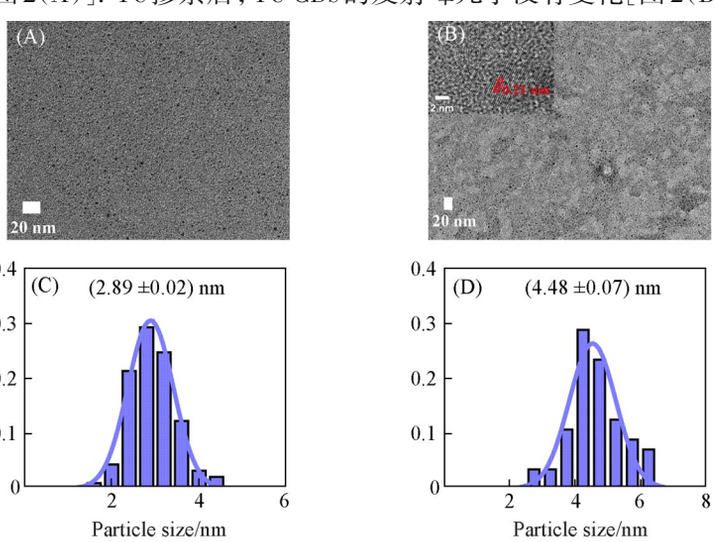


Fig. 1 TEM images(A, B) and particle size distributions(C, D) of R-CDs(A, C) and Fe-CDs(B, D)

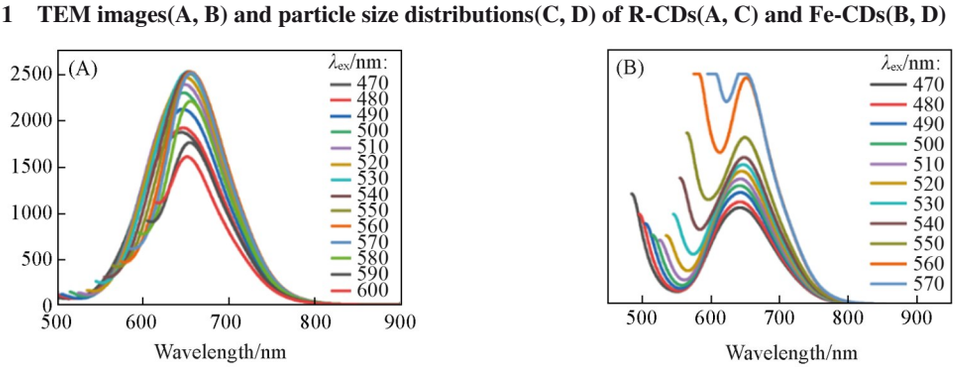


Fig. 2 Fluorescence emission spectra of R-CDs(A) and Fe-CDs(B) under different excitation wavelength

收光谱[图3(A)]中，R-CDs有2个吸收峰，分别位于250.38和520.40 nm，这可归因于芳香族π-π^*框架中的$n\rightarrow\pi^*$和电子跃迁[27]. 而Fe-CDs的吸收峰分别位于235.86和520.40 nm，这可能是由于Fe掺杂改变了CDs的局部电子环境所致[30]. 此外，掺杂Fe后的最佳激发波长也发生了改变，这进一步表明了Fe掺杂产生的影响. 进一步采用傅里叶变换红外光谱(FTIR)研究了Fe-CDs的官能团. 如图3(B)所示，与R-CDs类似，在3325.63和3202.59 cm^{-1}处的吸收峰分别归属于O—H和N—H；1616.35和1501.88 cm^{-1}处的峰分别归属于C═O和C═C/C═N的伸缩振动；817.69和599.35 cm^{-1}处的峰分别归属于C—H和C—Br的伸缩振动[27]. 与R-CDs不同的是，Fe-CDs的FTIR谱图在445.94 cm^{-1}处出现了一个峰，该峰归属于Fe—O—N的伸缩振动[31]，这证明了Fe已成功掺杂. 综合以上结果可知Fe-CDs表面含有丰富的含氧基团，这赋予了它良好的水溶性.

利用琼脂糖凝胶电泳对得到的环状模板链进行了验证. 如图4(A)所示，环状模板的条带位置与线

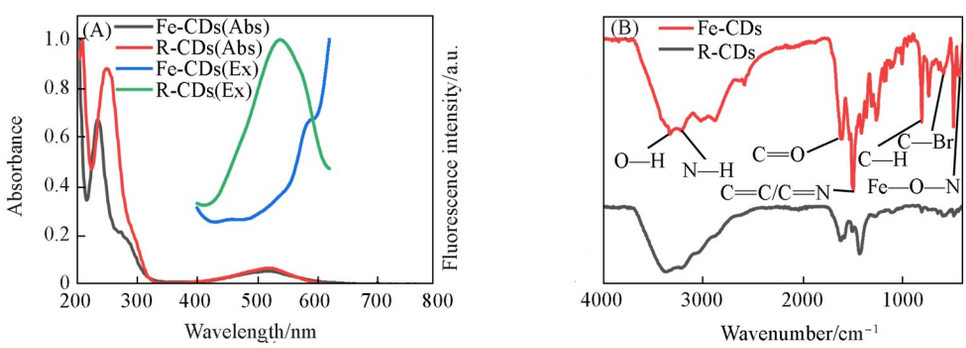


Fig. 3 UV-Vis absorption and fluorescence excitation spectra(A) and FTIR spectra(B) of R-CDs and Fe-CDs

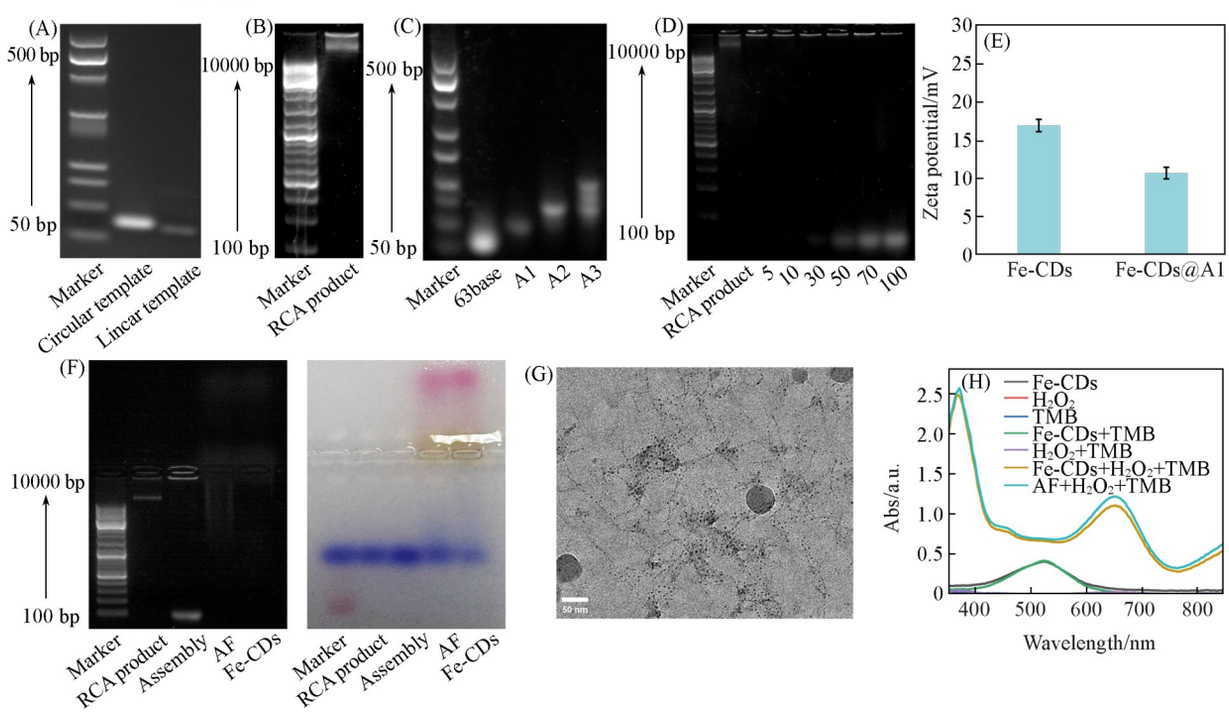


Fig. 4 Characterization and drug delivery profiles of RCA-based DNA/Fe-CDs assemblies

(A) Preparation of circular template; (B) preparation of RCA product; (C) verification of the step-by-step assembly of the assembly; (D) assembly optimization at varying short-chain DNA/RCA product molar ratios; (E) Zeta potential of Fe-CDs and Fe-CDs@A1; (F) the result of agarose gel electrophoresis of AF(left) and the agarose gel under white light(right); (G) TEM image of AF; (H) UV-Vis spectra of different materials. The specific fragment sizes of the DNA markers from bottom to top are 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, and 500 bp in (A) and (C). The DNA marker in (B), (D), and (F) ranges from 100 to 10000 bp, with prominent reference bands at 500, 1000, and 3000 bp.

性模板相近，但迁移速率稍慢．这种迁移率的滞后现象证实了所设计的模板链已实现环化[21]．琼脂糖凝胶电泳结果[图4(B)]表明，在Phi29 DNA聚合酶、环状模板链和引物存在的条件下，RCA产物成功生成．由于RCA产物以63个碱基作为重复单元，因此借助短链来验证组装体能否逐步组装．如图4(C)所示，随着短链的逐步增加，泳道内条带的迁移速率逐渐变慢，这表明生成了分子量更大的DNA产物，初步证明了组装的可行性．接着，在固定RCA产物浓度的情况下，对不同浓度的短链进行了优化[图4(D)]．结果表明，当RCA产物与短链的摩尔比为1∶50时出现未组装的短链．综合考虑组装效益，后续实验选用了该浓度比．Fe-CDs是通过酰胺化反应偶联到组装体的A1短链上，通过Zeta电位验证，可以从图4(E)看出，单独的Fe-CDs的Zeta电位是+16.9 mV，与A1偶联后，Zeta电位降至+10.7 mV．此外，还采用凝胶电泳实验进行了验证．从图4(F)可以看出，单独的Assembly滞留在胶孔内．由于Fe-CDs带正电荷，与Fe-CDs偶联后的组装体(AF)向相反方向迁移．从日光下的凝胶图可知，单独Fe-CDs的迁移速率快于AF，这证明了AF已成功制备．此外，由图4(G)可以看出，与单独的Fe-CDs相比，AF在TEM照片中呈现出明显规则的排列，这进一步证实了AF的成功制备．随后，借助TMB氧化实验，证实了Fe-CDs具备良好的类过氧化物酶活性．对AF类过氧化物酶活性的研究结果表明，AF和单一的Fe-CDs一样，同样保持着良好的类过氧化物酶活性[图4(H)]．

2.2 DOX的负载与释放

广谱抗癌药DOX利用其平面四环结构特异性嵌合入DNA的CG碱基对中，通过阻断DNA复制和转录来实现杀伤癌细胞的目的．为了探究组装体负载药物的能力，绘制了DOX的标准曲线，标准曲线方程为y=5.15x+50.64[图5(A)]．DOX插入DNA碱基对后会发生荧光猝灭，因此可通过检测荧光猝灭程度计算负载药物的浓度．使用不同浓度的组装体进行了DOX负载实验．图5(B)结果显示，组装体与DOX的负载比达到1∶200．在明确了组装体对DOX的负载能力后，研究药物的释放情况也十分关键．脱氧核糖核酸酶I(DNase I)在高等生物和低等生物的各类组织细胞中分布广泛，是常用于降解DNA的典型内切酶[32]．从图5(C)可以看出，组装体负载DOX后，荧光发生猝灭；而在加入DNase I后，负载的DOX被释放出来，荧光逐渐恢复．由于Fe-CDs本身具有荧光，所以AF的荧光值比AD略大．并且，鉴于肿瘤微环境呈酸性，开展了DOX在不同pH值下的响应释放实验．结果显示，在pH=5.0和 pH=6.0的环境中，载药材料均能有效释放所负载的DOX．以上结果充分证明了DOX能够有效负载在AF上，且负载比例较高，同时也能实现有效的药物释放．

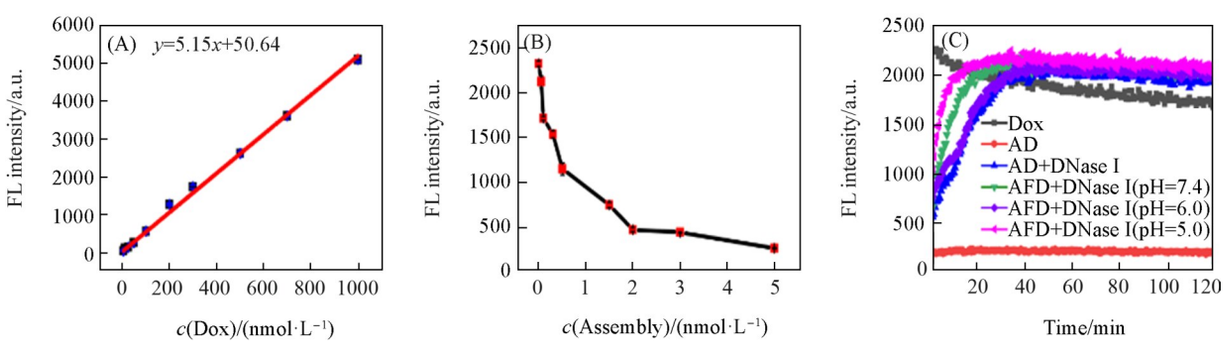


Fig. 5 Standard fluorescence curves of different DOX concentrations(A), changes of fluorescence intensity after DOX being loaded into assemblies of different concentrations(B) and AFD under the action of DNase I(C)

2.3 AF对肿瘤细胞的靶向性

精准靶向癌细胞是抗癌药物纳米载体的必要条件，这有助于减轻对正常细胞的损伤，从而提升治疗效果．基于此，对AF靶向癌细胞的能力进行了评估．将Fe-CDs、Fe-CDs偶联单价适配体(MF)和Fe-CDs偶联多价适配体(AF)分别与L929细胞(正常细胞)和MCF-7细胞(癌细胞)共同孵育30 min．倒置荧光显微镜图像[图6(A)和(C)]显示，在对照组、Fe-CDs组、MF组和AF组中，L929细胞对荧光的摄取强度极低；而在MF组和AF组中，MCF-7细胞的荧光强度逐渐增强．这一现象表明适配体在靶

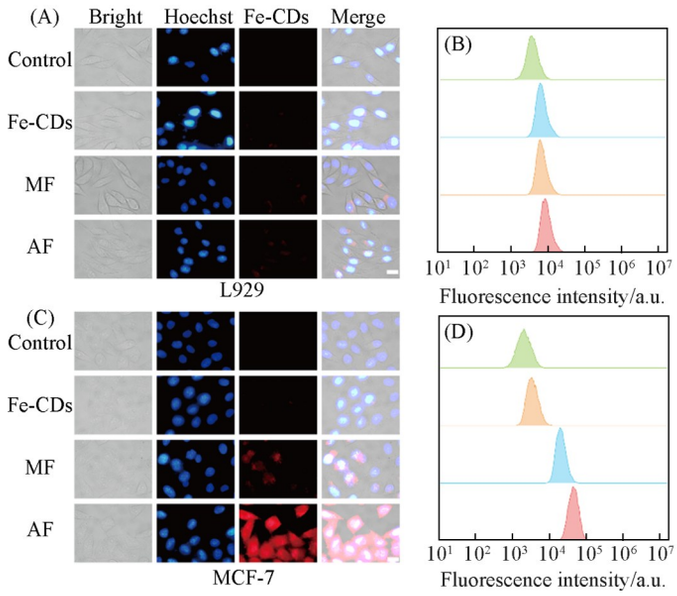


Fig. 6 Fluorescence microscopy images of L929(A) and MCF-7(C) cells after being incubated with Fe-CDs, MF, and AF for 30 min and the corresponding flow cytometry plots to analyze the fluorescence intensity of Fe-CDs inside L929(B) and MCF-7(D) cells

Scale bar: 20 μm.

向过程中发挥了关键作用，并且与单价适配体相比，多价适配体更能有效靶向癌细胞并被其内化．此外，借助流式细胞术进一步验证多价适配体AF的靶向能力．如图6(B)和(D)所示，AF组中MCF-7细胞内化的荧光强度值明显高于L929细胞，这进一步证实了AF具备出色的靶向能力．

2.4 AF在肿瘤细胞内的活性氧水平检测

鉴于AF能够有效靶向癌细胞，接下来验证其携带的Fe-CDs是否能产生足够多的活性氧，以用于化学动力治疗．DCFH-DA是一种常用的活性氧检测染料，具有良好的膜通透性，可进入细胞并被酯酶水解为无荧光的DCFH．当DCFH与活性氧相遇时，会被氧化成具有强绿色荧光的DCF，因此DCF的荧光强度可间接反映细胞内活性氧的水平．如图7所示，AF在癌细胞MCF-7内呈现出强烈的绿色荧光，

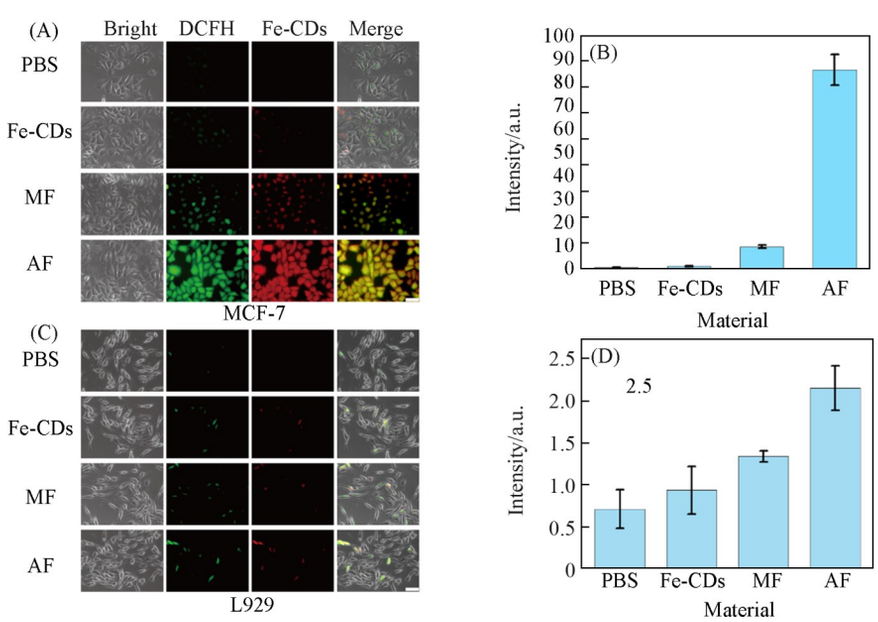


Fig. 7 Intracellular ROS generation after 30 min incubation with different materials

Fluorescence images and ImageJ quantitative analyses of (A, B) MCF-7 cells and (C, D) L929 cells. Scale bar: 40 μm.

ImageJ软件的统计分析结果也证实了这一点. 这一现象表明, 多价适配体携带的Fe-CDs能够有效进入细胞, 将细胞内的H_2O_2分解, 产生丰富的羟基自由基, 进而氧化DCFH形成DCF. 该结果证明了Fe-CDs具备化学动力学治疗的潜力.

2.5 AFD的体外细胞毒性评价

为确定负载药物的适宜浓度, 采用CCK-8测定法检测不同浓度DOX对L929和MCF-7细胞的毒性. 如图8(A)所示, 细胞在0~1000 nmol/L的DOX中孵育24 h, 存活率随DOX浓度的升高而逐渐降低. 综合考虑组装体负载比率并为减小DOX的毒副作用, 选取300 nmol/L的DOX, 组装体浓度为1.5 nmol/L. 此外, 为系统评估联合疗法的效果, 通过CCK-8检测不同药物浓度下L929和MCF-7细胞的增殖情况. 如图8(B)所示, 与单独使用DOX和Fe-CDs相比, AF组MCF-7细胞存活率显著降低, 而正常细胞L929受影响较小. 这是因为多价适配体增强了靶向能力, 可减少对正常细胞的损伤. AFD组MCF-7细胞存活率进一步下降, 这得益于负载的DOX能更精准地输送至癌细胞. 图8(C)为钙化素(Calcein)/碘化丙啶(PI)双染色MCF-7细胞的荧光显微镜图像. 不同药物制剂处理后, Calcein绿色荧光代表活细胞, PI红色荧光代表死细胞. 与对照组、DOX组和Fe-CDs组相比, AF组红色荧光增强. 通过统计红色与绿色荧光比值计算得出的细胞死亡率, 基本与CCK-8实验结果相符[图8(D)]. 而且, 化疗与化学动力学疗法结合比单一化学动力学疗法导致更多细胞死亡, 展现出抗肿瘤疗效, 在靶向癌症治疗中前景广阔. 此外, 还利用划痕实验考察了AFD对MCF-7细胞迁移的抑制作用. 如图8(E)和(F)所示, 对照组MCF-7细胞迁移较快, 36 h后划痕愈合率为49.8%, 加入Dox后愈合受限, 用AFD处理24 h后, 细胞状态变差, 划痕宽度基本不变, 愈合率近乎为0, 表明AFD能有效抑制肿瘤细胞迁移. 综上, AFD联合疗法作为精准治疗性纳米药物潜力巨大.

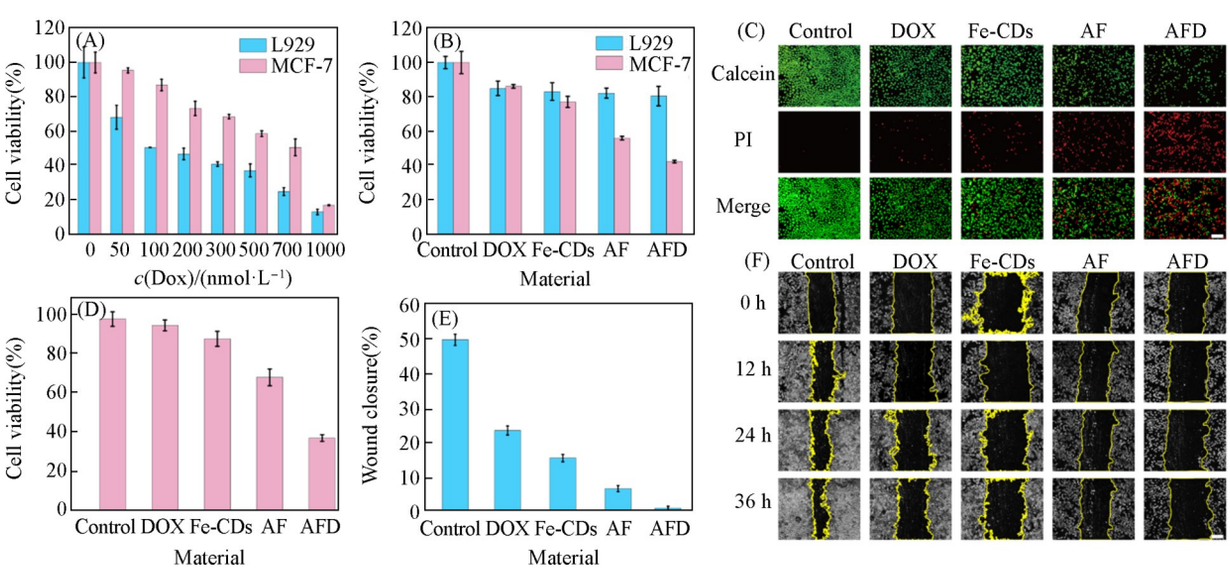


Fig. 8 ***In vitro*** **evaluation of the biocompatibility, cytotoxicity, and anti-tumor efficacy of the nanoplatform**

(A) Cell viability of L929 and MCF-7 cells after 24 h incubation with different concentrations of DOX; (B) cytotoxicity of different materials(DOX: 30 nmol/L, Fe-CDs: 50 μg/mL, AF: 1.5 nmol/L, AFD: 1.5 nmol/L) on L929 and MCF-7 cells; (C) cell survival rate based on the proportion of red and green areas in the live-dead staining results; (D) healing rate of MCF-7 cells after treatment with different materials; (E) wound closure assay of MCF-7 cells after treatment with different materials; (F) fluorescence images of live/dead staining of MCF-7 cells after treatment with different materials.

(E, F) Scale bar: 200 μm.

3 结　　论

借助RCA产物作为柔性支架, 通过设计与之互补的序列, 使其与RCA产物实现自组装. 这一过程能够灵活地将适配体、Fe-CDs和DOX进行负载, 构建出多价适配体AFD, 达成了Fe-CDs和DOX的协

同递送. 由此, AFD能够高效地靶向癌细胞, 并将其杀灭. 通过荧光成像和流式细胞术等实验手段, 充分证实了AFD具备出色的靶向癌细胞能力, 可显著减少对正常细胞的毒副作用. 当AFD精准靶向癌细胞后, 细胞内的多种水解酶会对其进行分解, 从而释放出负载的药物. 其中, 负载的Fe-CDs不仅能够作为靶向制剂, 精准定位癌细胞, 还能充当化学动力学疗法的制剂, 发挥独特的治疗作用; 而DOX则可以干扰细胞核内DNA的合成, 进而有效抑制细胞的增殖. CCK-8实验和活死细胞染色结果进一步证实了AFD的治疗效果. 本研究将药物结合机制与药物释放过程和治疗效果相关联, 为开发基于Fe-CDs的DNA组装体联合治疗策略提供了思路.

参 考 文 献

[1] Saini A., Kumar M., Bhatt S., Saini V., Malik A., *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **2020** *11*(7), 3121—3134
[2] Zhao R., Liu X., Yang X., Jin B., Shao C., Kang W., Tang R., *Adv. Mater.*, **2018**, *30*(27), 1801304
[3] Ye X., Liang X., Chen Q., Miao Q., Chen X., Zhang X., Mei L., *ACS Nano*, **2019**, *13*(3), 2956—2968
[4] Zhao P., Li H., Bu W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(7), e202210415
[5] Li S., Jiang P., Jiang F., Liu Y., *Adv. Funct. Mater.*, **2021**, *31*(22), 2100243
[6] Yang X., Zhang H., Wu Z., Chen Q., Zheng W., Shen Q., Wei Q., Shen J. W., Guo Y., *J. Controlled Release*, **2024**, *376*, 646—658
[7] Tian H., Zhang M., Jin G., Jiang Y., Luan Y., *J. Colloid Interface Sci.*, **2021**, *587*, 358—366
[8] Ma J., Li N., Wang J., Liu Z., Han Y., Zeng Y., *Exploration*, **2023**, *3*(5), 20220161
[9] Li S. S., Wang A. J., Yuan P. X., Mei L. P., Zhang L., Feng J. J., *Chem. Sci.*, **2022**, *13*(19), 5505—5530
[10] Lu Y., Zhu X., Huo Y., Zhang H., Yang Z., Wang Z., Wu X., Jin Y., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2025**, *310*, 143286
[11] Pan Y., Fang L., Gu S., Chen L., Wu C., Xue S., Tang Y., Dou D., Liu C., *Carbon*, **2025**, *236*, 119987
[12] Lu X., Sun W., Zheng X., Yang L., Feng T., Deng X., Zhou F., Zhu H., Ma D., Li B., Ning G., Chen H., Yang Y., Zhao H., Li C. P., *Chem. Eng. J.*, **2025**, *509*, 161355
[13] Wang H., Lu X., Fan J., Yang C., Zhu H., Liu J., Ding B., *Nano Today*, **2025**, *62*, 102734
[14] Sigl C., Willner E. M., Engelen W., Kretzmann J. A., Sachenbacher K., Liedl A., Kolbe F., Wilsch F., Aghvami S. A., Protzer U., Hagan M. F., Fraden S., Dietz H., *Nat. Mater.*, **2021**, *20*(9), 1281—1289
[15] Li Y., Chen R., Zhou B., Dong Y., Liu D., *Adv. Mater.*, **2024**, *36*(7), 2307129
[16] Faiad S., Laurent Q., Prinzen A. L., Asohan J., Saliba D., Toader V., Sleiman H. F., *Angew. Chem.*, **2023**, *135*(51), e202315768
[17] Gao Q., Wang W., Sun S., Yang Y., Mao K., Yang Y., Wu Z. S., *Mater. Today Bio.*, **2025**, *32*, 101718
[18] Sun D., Song Y., Gao W., Lin B., Wang B., Yang X., Li S., Jin Y., Zhang J., *Int. J. Pharm.*, **2024**, *667*, 124910
[19] You X., Wang J., Guo X., Yang D., *Adv. NanoBiomed Res.*, **2024**, *4*(3), 2300108
[20] Zhang Z., Xu D., Wang J., Zhang R., Du H., Zhou T., Wang X., Wang F., *Biomacromolecules*, **2023**, *24*(1), 439—448
[21] Ning G., Wang F., Zhang R., Du H., Weng T., Wang X., Zhou T., Zhang G., Zhang Z., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2025**, *310*, 143343
[22] Wang S., Liu X., Wei D., Zhou H., Zhu J., Yu Q., Luo L., Dai X., Jiang Y., Yu L., Yang Y., Tan, W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, *146*(44), 30033—30045
[23] Bila H., Paloja K., Caroprese V., Kononenko A., Bastings M. M. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(47), 21576—21586
[24] Guo L., Zhang Y., Wang Y., Xie M., Dai J., Qu Z., Zhou M., Cao S., Shi J., Wang L., Zuo X., Fan C., Li J., *Angew. Chem.*, **2022**, *134*(18), e202117168
[25] Xia F., He A., Zhao H., Sun Y., Duan Q., Abbas S. J., Liu J., Xiao Z., Tan W., *ACS Nano*, **2022**, *16*(1), 169—179
[26] Hu X., Chi H., Fu X., Chen J., Dong L., Jiang S., Li Y., Chen J., Cheng M., Min Q., Tian Y., Zhang P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, *146*(4), 2514—2523
[27] Ning G., Wang F., Du H., Zhang R., Huo X., Wang X., Zhou T., Zhang G., Zhang Z., *Talanta*, **2025**, *285*, 127436
[28] Singh S., Mishra A., Kumari R., Sinha K. K., Singh M. K., Das P., *Carbon*, **2017**, *114*, 169—176
[29] Zhong J., Huo L., Zhong H., Li P., *Diam. Relat. Mater.*, **2026**, *162*, 113286
[30] Chen W., Ball A. S., Cole I., Yin H., *Sustainability*, **2025**, *17*(8), 3642
[31] Stan C. S., Coroabă A., Ursu E. L., Secula M. S., Simionescu B. C., *Sci. Rep.*, **2019**, *9*(1), 18893
[32] Du H., Wang F., Zhang R., Yan X., Zheng J., Zhou T., Wang X., Zhang G., Zhang Z., *Biomacromolecules*, **2024**, *25*(8), 4991—5007

(Ed.: H, K, M)