

· 药咖论坛 ·

## 纳米药物递送系统体内命运分析 新方法与新技术研究进展

王心怡<sup>1,2#</sup>, 付淑军<sup>3#</sup>, 孟祥骏<sup>1</sup>, 吴伟<sup>4\*</sup>, 顾景凯<sup>2\*\*</sup>

(1. 天津大学医学部药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 吉林大学超分子结构与材料国家重点实验室超分子化学生物学研究中心  
生命科学学院药物代谢研究中心, 吉林 长春 130012; 3. 国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022; 4. 复旦大学药学院,  
上海 201203)

**[摘要]** 纳米药物递送系统 (NDDSs) 能够改善药物的药代动力学行为, 将活性药物成分靶向递送至病灶, 并控制药物释放。近年来, 随着纳米技术的快速发展, NDDSs 在医药领域展现出巨大潜力, 已成为该领域的研究热点。对 NDDSs 的体内命运进行精准分析, 是揭示其复杂体内过程, 实现纳米药物安全、有效递送的关键之一。NDDSs 在体内包含负载型药物、游离型药物、纳米载体和载体材料等多种形态成分, 在复杂的生命体系中全面精准分析这些成分动态变化具有极高的技术挑战。受分析方法与分析技术的制约, 目前对于 NDDSs 的体内命运研究仍存在许多挑战, 极大阻碍了 NDDSs 的快速发展与临床转化。综述对 NDDSs 中游离型药物、负载型药物、纳米载体和纳米材料的分析新方法、新技术及其在纳米药代动力学中的应用进行介绍, 并对该领域未来研究方向提出展望, 以期对 NDDSs 的体内命运相关研究提供参考。

**[关键词]** 纳米药物递送系统; 纳米载体; 体内命运; 生物分析; 新方法与新技术

**[中图分类号]** R917; R969.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-5094 (2024) 10-0747-14

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2024.10.004

## Research Progress of New Methods and Technologies for *in Vivo* Fate Analysis of Nanocarrier Drug Delivery Systems

WANG Xinyi<sup>1,2</sup>, FU Shujun<sup>3</sup>, MENG Xiangjun<sup>1</sup>, WU Wei<sup>4</sup>, GU Jingkai<sup>2</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Faculty of Medicine, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Center for Supramolecular Chemical Biology, State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials / Research Center for Drug Metabolism, School of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130012, China; 3. Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China; 4. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** Nanocarrier drug delivery systems (NDDSs) can improve the pharmacokinetic behavior of drugs, target the delivery of active pharmaceutical ingredients to diseased areas and control drug release. In recent years, with the rapid development of nanotechnology, NDDSs have shown great potential in the field of medicine and have become a hot research topic. Precise analysis of the *in vivo* fate of NDDSs is key to revealing their complex *in vivo* processes and achieving safe and effective delivery of nanomedicines. NDDSs *in vivo* encompass various components such as encapsulated drugs, free drugs, nanocarriers, and nanocarrier materials, making it highly challenging to comprehensively and accurately analyze the dynamic changes of these components within the complex living system. Limited by analytical methods and techniques, there are still many challenges in the study of the *in vivo* fate of NDDSs, which greatly hinders their rapid development and clinical translation. This review focuses on new analytical methods and technologies as well as their applications in nano-pharmacokinetics for free drugs, encapsulated drugs, nanocarriers and nanomaterials in NDDSs. It also proposes future research directions in this field, aiming to provide some reference for relevant research on the *in vivo* fate of NDDSs.

**[Key words]** nanocarrier drug delivery system; nanocarrier; *in vivo* fate; bioanalysis; new method and new technology

**接受日期:** 2024-08-02

**项目资助:** 国家自然科学基金 (No. 82030107, No. 2373944, No. 82304443)

**\* 通信作者:** 吴伟, 教授, 博士生导师; **研究方向:** 药物载体给药系统体内时空命运、口服给药系统、药物新剂型与新技术;

**E-mail:** wuwei@shmu.edu.cn

**\*\* 通信作者:** 顾景凯, 教授, 博士生导师; **研究方向:** 超分子药物递送系统生物命运、药物代谢动力学、体内药物分析;

**E-mail:** gujk@jlu.edu.cn

**# 贡献等同**

1995年, 美国食品和药品管理局 (food and drug administration, FDA) 批准了首个抗癌纳米药物 Doxil<sup>[1]</sup>。在过去的30年里, 纳米药物递送系统 (nanocarrier drug delivery systems, NDDSs) 发展迅速, 迄今已有几十万篇相关论文发表<sup>[2]</sup>。然而, 尽管论文数量庞大, NDDSs 的实际临床转化却十分有限。截至2023年末, 仅有90多个纳米药物上市<sup>[2]</sup>。与普通制剂相比, 这些纳米药物在临床依从性方面有了极大提高, 但大多数在临床疗效方面并未取得显著的改善<sup>[1,3]</sup>。

与普通药物制剂不同, NDDSs 在体内始终存在“载药粒子-游离型药物-解聚载体材料”多种形态的动态变化过程, 该过程与其体内药代动力学行为、药效作用和毒性反应密切相关。其中, 载药粒子是药物的运输工具和储库, 靶部位/靶点 (如肿瘤组织) 中的游离药物是药效的物质基础, 而其他组织中的游离药物、载药粒子、解聚载体材料等则可能导致毒性/不良反应。因此, 充分了解 NDDSs 各形态组分的体内药代动力学信息, 对其安全性和有效性评价以及制剂处方的设计与优化具有重要意义<sup>[4-5]</sup>。以往由于缺少前瞻性的理论指导, 尤其是缺少有效的分析策略与技术手段, 在复杂的生命系统中对 NDDSs 游离药物、载药粒子、解聚载体材料的药代动力学过程进行精准分析, 无疑存在巨大的挑战, 已成为制约 NDDSs 临床转化成功率的最主要瓶颈之一<sup>[6]</sup>。

针对上述问题, 本文聚焦 NDDSs 在体内存在的不同形态成分, 对近年来用于追踪 NDDSs 体内时空命运的先进分析策略与分析技术进行综述, 以期对 NDDSs 的药代/毒代动力学、安全性与有效性评价以及 NDDSs 的处方设计与工艺优化研究提供比较全面的技术支持, 进而提高 NDDSs 的临床转化成功率。

## 1 游离型、负载型药物和纳米载体分离分析技术

传统的药物分析技术只关注 NDDSs 中药物的总浓度, 无法阐明药物是负载于载药粒子还是已经从载体中释放出来<sup>[7]</sup>。由于 NDDSs 改变了药物的分布, 其所负载药物的吸收、分布、代谢、排泄行

为相比普通制剂往往会发生显著变化<sup>[7]</sup>。因此, 为了能够更准确地评估纳米药物的有效性与安全性, 区分游离型药物和负载型药物是极为重要的。在复杂的生命系统中, 纳米药物的递送过程面临多种挑战, 为确保所设计的纳米载体的优良性能, 监测纳米载体的体内转运过程也是十分必要的<sup>[8]</sup>。下文将对 NDDSs 游离型药物、负载型药物和纳米载体的分离与分析技术进行介绍。

### 1.1 固相萃取技术

固相萃取 (solid phase extraction, SPE) 技术基于液-固相色谱理论, 通过选择性吸附和选择性洗脱的方式对样品中不同组分进行分离。脂质体是由脂质双层构成的球形囊泡。作为首个成功应用于临床的纳米载体<sup>[9-12]</sup>, 脂质体以独特的两亲性结构, 即亲水核心和被脂质层包围的疏水空间, 为封装不同极性的药物提供了可能<sup>[9,13]</sup>。Wang 等<sup>[14]</sup>开发了一种 SPE 结合液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 检测聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 化长循环阿霉素 (doxorubicin, DOX) 脂质体的负载型 DOX 和游离型 DOX 的分析方法。该方法利用 PEG 化长循环 DOX 脂质体在反相固相萃取小柱上保留能力差, 而游离型 DOX 在反相固相萃取小柱上保留能力强的原理, 能够从组织样本中分离出 PEG 化 DOX 脂质体 (负载型 DOX); 然后利用 LC-MS/MS 分别检测负载型 DOX 浓度和 DOX 总浓度, 并通过二者差值计算出游离型 DOX 的浓度。该研究比较了荷瘤小鼠正常组织和肿瘤组织中 PEG 化脂质体内 DOX 的释放与摄取曲线, 结果表明脂质体能有效地将 DOX 释放到肿瘤中, 与直接给药 DOX 溶液相比, 脂质体使肿瘤对 DOX 的吸收量增加了 1.8 倍; 脂质体还降低了 DOX 在心脏的分布量, 从而减少了 DOX 的心脏毒性。

### 1.2 荧光成像技术

近年来, 荧光成像技术凭借其高灵敏度、操作简便等特性使其在药物递送系统中得到广泛应用<sup>[15]</sup>, 常被用于标记 NDDSs 并对其可视化追踪<sup>[16]</sup>。下文将对常用于 NDDSs 游离型药物、负载型药物和纳米载体的荧光成像技术进行介绍。

**1.2.1 聚集诱导发光技术** 聚集诱导发光 (aggregation-induced emission, AIE) 是指某些分子在分散状态下几乎不发光, 但当它们聚集在一起时, 发光效率显著提高<sup>[17]</sup>。聚合物胶束是两亲性聚合物分子在水相介质中达到或超过临界胶束浓度 (critical micelle concentration, CMC) 后自发形成的一种有序结构。两亲性聚合物分子亲脂性尾部因其疏水作用而聚集于胶束内部, 亲水性的头部则因具有极性而向外部延伸<sup>[18-19]</sup>。聚合物胶束的疏水核心能够通过疏水相互作用有效地负载疏水性药物, 其亲水外壳与周围的水分子相互作用, 保护胶束不被网状内皮系统识别<sup>[20]</sup>, 进而对胶束内部的疏水基团起到保护作用。Sun 等<sup>[21]</sup> 通过将氧化还原敏感的二硫键和 AIE 荧光团 Tripp 连接于甲氧基聚乙二醇 (methoxy polyethylene glycol, mPEG), 制备了 mPEG-ss-Tripp 聚合物胶束, 并以 DOX 作为药物模型, 成功构建出能够同时实现癌症治疗与细胞内成像的智能给药系统。当细胞内谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 还原 mPEG-ss-Tripp 中的二硫键时, 聚合物胶束迅速释放药物来抑制肿瘤转移, 同时通过监测 Tripp 的 AIE 信号变化来研究胶束的细胞内释药行为。

聚合物纳米粒利用其独特的结构通过吸附或共轭作用使其于聚合物基质或载体表面携带药物<sup>[22]</sup>, 从而实现药物的递送。Wang 等<sup>[23]</sup> 制备了一种负载姜黄素 (curcumin, Cur) 的聚乳酸-羟基乙酸 [poly(lactic-co-glycolic) acid, PLGA] 纳米粒 (Cur@PLGA-NPs)。Cur 是一种具有 AIE 性质的药物, 在与 PLGA 纳米粒结合后, 利用其荧光特性监测载药纳米粒在细胞内的分布。该纳米粒与 CT26 细胞孵育后, 由于 Cur 的 AIE 特性, 载药 Cur 纳米粒在细胞中表现出红色荧光, 且其荧光强度呈现出浓度依赖性, 这表明 Cur 纳米粒被成功内化到 CT26 细胞中。

Wang 等<sup>[24]</sup> 报道了蛋白冠对阳离子脂质体与细胞相互作用的影响。该研究将具有 AIE 效应的 TR4 作为细胞膜探针, 引入阳离子脂质体 (TR4 脂质体)。当 TR4 以单体形式存在时不发出荧光, 而一旦其插入脂质体中就会发射出较强的荧光。通过成像定位技术, 该研究分别对含蛋白冠和不含蛋白冠的脂质

体组的观察结果显示, 蛋白冠的形成对阳离子脂质体的转运行为产生了显著的影响, 即当脂质体表面形成蛋白冠后, 其与细胞的相互作用方式从能量非依赖性的膜融合转变为能量依赖性的内吞作用。

Xu 等<sup>[20]</sup> 设计并成功合成了一种具有 AIE 特性的壳聚糖, 该壳聚糖通过引入疏水性片段、基于二苯甲酮结构的 AIE 荧光团、肿瘤靶向配体和酸敏键, 实现了对肿瘤的靶向作用及在酸性条件下的药物释放。该壳聚糖的两亲性使其能够自组装形成包封含紫杉醇的胶束。这种“可视化”胶束系统不仅能够对肿瘤中有效聚集并特异性释放药物, 而且能实时监测药物行为。在 MCF-7 细胞实验中, 孵育 2 h 即可在细胞质中观察到来自该胶束系统的黄色荧光, 这一现象表明胶束已成功被肿瘤细胞内化。随着孵育时间的延长, 荧光强度逐渐增强, 进一步说明了肿瘤细胞对胶束的内吞量在不断增加。类似地, Kulkarni 等<sup>[25]</sup> 将基于四苯乙烯 (tetraphenylethylene, TPE) 的 AIE 荧光团掺入聚乙二醇-聚己内酯 [poly(ethylene glycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone), PEG-b-PCL] 中, 该嵌段共聚物可通过自组装形成包封有 DOX 和 Cur 的胶束, 可以同时实现肿瘤给药与纳米载体的生物成像示踪。

AIE 效应最显著的优势是在聚集状态下荧光信号的增强, 这大大提高了检测的灵敏度。由于 AIE 探针在溶液中几乎不发光, 其可有效减少背景信号, 提高信噪比。虽然 AIE 探针在聚集时发光强, 但这也可能导致空间分辨率的不足。在 AIE 探针高度聚集的区域, 过强的荧光信号可能掩盖细微的结构信息, 特别是在亚细胞结构的研究中。在某些生物环境下, 非特异性吸附可能使 AIE 探针重新聚集, 导致产生错误的荧光信号, 影响实验结果的准确性。另外, 负载的 AIE 探针在体内从纳米载体上释放行为未必与药物完全一致, 这也会影响负载型药物分析结果的准确性。

**1.2.2 聚集发光淬灭技术** 聚集发光淬灭 (aggregation-caused quenching, ACQ) 荧光探针具有强疏水性<sup>[26]</sup>, 在有机溶剂中具有良好的荧光发射性质。随着环境含水量的增加, ACQ 荧光探针的荧光发射强度会经历一个显著的变化过程。当含水量达到某一特定值

时, ACQ 荧光探针的荧光发射强度会迅速下降, 而当其处于绝对水环境时, 由于分子间的聚集作用, 其荧光发射会完全淬灭<sup>[27]</sup>。ACQ 荧光探针在检测纳米载体完整性方面具有重要的应用价值, 当纳米载体保持完整时, 其内部的 ACQ 探针由于处于有机环境而发出强烈的荧光; 当纳米载体发生解聚或分解时, ACQ 探针由于暴露于水环境中而发生荧光强度降低, 甚至完全淬灭。

复旦大学吴伟教授课题组开发了一种利用近红外荧光染料的 ACQ 特性来监测完整纳米载体体内命运的新策略。该技术已被成功应用于研究多种纳米载体的体内命运<sup>[28-33]</sup>。He 等<sup>[34]</sup>采用该策略标记和追踪口服聚合物胶束的体内命运发现, 大鼠口服聚合物胶束后, 其在胃肠道中至少保留 4 h, 血液和肝脏中出现的荧光直接证明完整聚合物胶束的口服吸收, 且约 1%~2% 的完整胶束通过淋巴途径被吸收。Wu 等<sup>[35]</sup>也将 ACQ 探针封装到聚合物胶束中来跟踪胶束的体内命运。

纳米乳是一种由水、油和适当的表面活性剂自组装形成的纳米体系<sup>[10]</sup>。Jiang 等<sup>[36]</sup>利用 ACQ 荧光探针的特性, 对石杉碱甲纳米乳 (huperzine A-nanoemulsion, HupA-NE) 及乳铁蛋白修饰的石杉碱甲纳米乳 (lactoferrin-huperzine A-nanoemulsion, Lf-HupA-NE) 在大鼠体内的转运进行了示踪。活体成像结果显示, HupA-NE 和 Lf-HupA-NE 经鼻腔给

药后, 均可通过神经和血液循环转运到脑中。

可溶性微针是近年来研究较多的一类微针, 其主要由水溶性高分子材料制备而成, 药物分布在针尖的基质中, 当微针刺入皮肤后, 针尖通过吸收组织液逐渐溶解, 并释放出封装的药物<sup>[35]</sup>。Fu 等<sup>[26]</sup>将 ACQ 探针负载于固体脂质纳米粒, 进一步将二者一并封装到可溶性微针中, 随后追踪固体脂质纳米粒在大鼠不同皮肤部位的透皮扩散情况。活体成像显示, 随着时间推移, 大鼠不同皮肤部位的荧光强度均逐渐降低, 表明负载于纳米载体的 ACQ 探针因暴露于生物基质而发生荧光淬灭。

Naghibi 等<sup>[37]</sup>将四苯乙烯溴代异丁酸酯 (tetraphenylethene-bromoisobutyrate, TPE-BIB) 与 PEG 和肼 (hydrazine, Hyd) 结合, 合成出一种新型刷状聚合物 TPE-PEGA-Hyd, 其中肼为 DOX 的结合位点。该聚合物不仅具有 PEG 的优良特性, 还因 TPE-BIB 的引入而具备了 AIE 性能, 为药物递送和体内示踪提供了有力的工具。TPE-BIB 是能够发出蓝色荧光的 AIE 荧光团, 其荧光强度在聚集状态下显著增强, 而 DOX 在作为药物模型的同时, 还具有 ACQ 特性, 其红色荧光在聚集状态下较弱 (见图 1)。TPE-PEGA-Hyd-DOX 在肿瘤细胞的低 pH 环境中由于肼的裂解而释放 DOX。因此, 通过该体系 410 nm (蓝色) 和 600 nm (红色) 的荧光比率, 可以实现对药物在体内的实时监测。

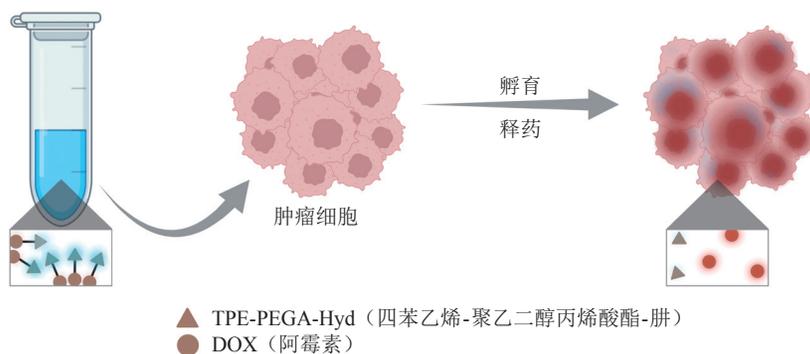


图 1 TPE-PEGA-Hyd 和 TPE-PEGA-Hyd-DOX 的荧光示意图

Figure 1 Schematic representation of fluorescence of TPE-PEGA-Hyd and TPE-PEGA-Hyd-DOX

ACQ 是示踪负载型药物和载体粒子的重要技术手段。在许多生物检测中, ACQ 效应可减少背景信号, 有助于提高检测信噪比。然而, 基于 ACQ 的

生物成像不适用于亲水性纳米载体, 因为 ACQ 探针很难被包裹到亲水性基质中, 且水分子会迅速吸收到亲水性基质中, 导致探针聚集和荧光淬灭。由

于 ACQ 效应依赖于荧光分子的聚集程度, 这使得精确的定量分析变得较为复杂。此外, 同 AIE 探针一样, 负载的 ACQ 探针在体内从纳米载体上释放行为未必与药物完全一致, 这可能会导致对负载型药物的分析不准确。

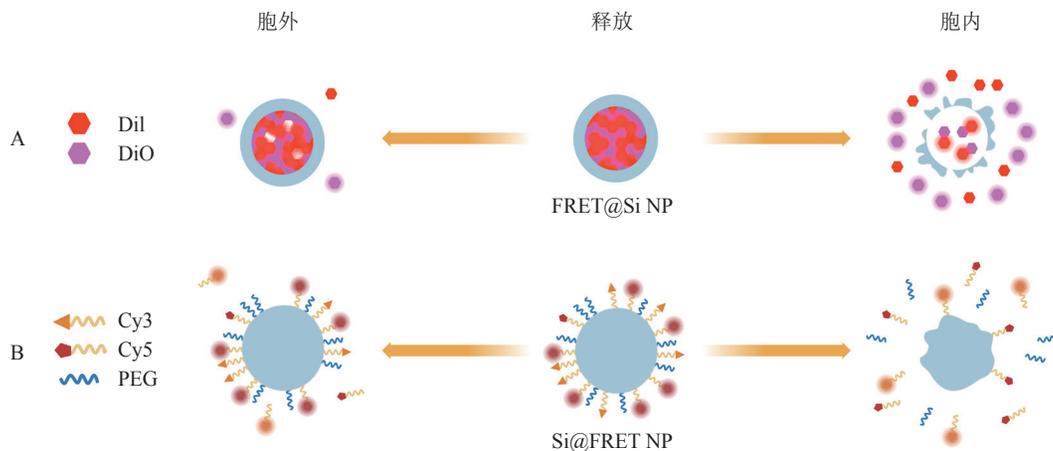
**1.2.3 荧光共振能量转移技术** 荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 是 2 个荧光团 (一个作为供体, 另一个作为受体) 之间的能量转移过程, 当供体的发射光谱与受体的激发光谱在很大程度上重叠, 且 2 种荧光探针之间的距离非常接近时, 二者之间就会发生能量转移, 处于激发态的供体以非激发方式将能量传递给旁边的受体, 使得供体发射的荧光强度衰减, 受体荧光分子的荧光强度增加<sup>[38]</sup>。FRET 技术为监测 NDDSs 的药物释放和载体完整性提供了一种强大的工具<sup>[39]</sup>。在实验设计中, 将供体和受体分别标记在纳米材料和药物分子上, 当药物从纳米材料中释放时, 受体与供体之间的距离发生变化, 进而引起 FRET 信号的变化。因此, 通过分析 FRET 信号的变化, 不仅可以用来监测药物的释放, 还能够用于指征有机纳米载体的完整性<sup>[17,40]</sup>。在选择 FRET 染料时, 通常倾向选择具有近红外范围发射光谱的染料, 这是因为近红外光能够更好地穿透细胞和组织, 从而避免来自这些生物结构自发荧光的干扰<sup>[40]</sup>。

Zhong 等<sup>[41]</sup>合成了含有 TPE 的 pH 响应型纳米复合体, 且以 DOX 作为药物模型。通过监测 DOX 与 TPE 之间的 FRET 信号变化, 在肿瘤细胞内追踪由 pH 变化触发的 DOX 动态释放过程。Laskar 等<sup>[42]</sup>将 2 种疏水性荧光抗癌药物 Cur 和喜树碱 (camptothecin, Cpt) 分别通过酯键和氧化还原响应型二硫键与 PEG 连接, 成功合成出两亲性的 PEG 化前药 Cpt-S-S-PEG-Cur。由于前药聚合物能够在水中形成稳定的纳米组装以及 Cpt (FRET 供体) 的发射光谱与 Cur (FRET 受体) 吸收光谱之间的重叠, 供受体之间能够产生 FRET 信号。在与肿瘤相关的氧化还原环境 (存在一定量的 GSH) 中, 这些稳定的纳米组装显示出 Cpt 的优先释放, 导致 FRET 消失。因此, 这种基于 GSH 响应型 FRET 的递药系统能够实现以非侵入方式来监测载体中的药物释放。

Zhou 等<sup>[43]</sup>报道了一种含供体荧光团 DAN-聚丙烯硫醚 (polypropylene sulfide, PPS)-mPEG 与受体荧光团 DAB-PPS-mPEG 的新型氧化响应型聚合物胶束。当活性氧存在时, 该胶束中的 PPS 嵌段发生氧化并分解, 导致供体荧光团淬灭, 从而触发 FRET 过程的变化, 这种设计使得药物释放与荧光信号变化直接相关。该研究以尼罗红为模型药物, 探究了胶束荧光变化与胶束降解及药物释放之间的关系。

纳米晶在改善水溶性差的药物口服生物利用度方面展现出巨大潜力, 然而, 关于纳米晶如何提高口服生物利用度的具体机制, 目前仍存在一定争议, 这主要是由于在研究中无法同时追踪溶解的药物和纳米晶颗粒所导致。目前对此存在 2 种不同的观点: 一是通过纳米晶减小粒径从而改善溶解度; 二是通过纳米晶的内吞作用改善口服吸收<sup>[44]</sup>。Zhang 等<sup>[17]</sup>以香豆素 6 为药物模型制备纳米晶, 通过 ACQ 信号来检测游离的香豆素 6, 同时将 2-((5-(4-(二苯基氨基)苯基)噻吩-2-基)亚甲基)丙二腈 [2-((5-(4-(dip-tolylamino)phenyl)thiophen-2-yl)methylene)malononitrile, MeTTMN] 掺入香豆素 6 构建 FRET 对, 并通过监测 FRET 信号跟踪纳米晶体颗粒。研究表明, 该纳米晶体主要通过快速溶解改善药物的口服吸收, 成功阐明了纳米晶如何提高药物的口服吸收。

Tengjisi 等<sup>[38]</sup>通过合成 2 种类型的 FRET 纳米粒, 成功构建了能够同时监测药物释放与二氧化硅纳米粒降解的系统。该研究中疏水性 FRET 对 (DiO 和 DiI) 被共同封装在纳米粒核心 (FRET@Si NP), 用作药物替代物以模拟药物包封和药物释放。当 DiO 和 DiI 足够接近时, 可以观察到来自 DiI 的 FRET 信号。然而, 一旦 2 种染料因药物释放而分离, DiI 信号消失, DiO 信号则会出现 (见图 2A)。同时, 另一组 FRET 对 (Cy3 和 Cy5) 被用于二氧化硅纳米粒的外表面标记 (Si@FRET NP), 用于监测二氧化硅的降解。当二氧化硅壳完整时, 可观察到来自 Cy5 的 FRET 信号; 随着二氧化硅的降解, Cy3 信号开始增加, 而 Cy5 信号降低 (见图 2B)。通过使用这 2 个 FRET 纳米系统, 药物释放和二氧化硅纳米粒的降解可以被分别监测。



DiI: 细胞膜红色荧光探针; DiO: 细胞膜绿色荧光探针; FRET: 荧光共振能量转移; NP: 纳米粒; Cy3: 3H-吡啶菁红橙色染料; Cy5: 3H-吡啶菁红色染料; PEG: 聚乙二醇

图2 NPs的胞外和胞内荧光探针释放示意图

Figure 2 Schematic representation of NPs releasing fluorescence probes extracellularly and intracellularly

FRET 信号的产生依赖于供体发射光谱与受体吸收光谱的重叠及两者适当的空间配置, 这保证了检测的特异性。FRET 技术提供了强大的定性分析能力, 但其在定量分析方面仍面临着诸多挑战。例如, FRET 效率的计算需要考虑多种因素, 包括供体和受体的光谱重叠、荧光寿命、荧光量子产率等, 这些均需要复杂的数学模型和校正方法。因此, FRET 技术尚难以实现全面的药代动力学分析。此外, FRET 荧光染料的生物活性也可能会影响 NDDSs 的药代动力学特性。

**1.2.4 碳量子点** 碳量子点 (carbon quantum dots, CQDs) 是一种零维碳纳米材料, 具有众多优于有机荧光团的特性<sup>[45]</sup>。首先, CQDs 高度的光稳定性确保了其在各种环境下均能保持稳定的发光性能。其次, CQDs 具有可调节发射特性, 使其发射波长可根据需要进行调整, 从而满足不同的应用场景。再者, CQDs 较大的双光子激发截面使其在较低能量激发下也能实现高效发光, 有利于降低高能激光对生物组织的损害。此外, CQDs 还具有优异的细胞渗透性和生物相容性。Mazandarani 等<sup>[46]</sup>合成了一种壳聚糖-适体-碳量子点 (chitosan-aptamer-carbon quantum dot, CS-Apt-CQD) 纳米水凝胶, 通过乳化法将 5-氟尿嘧啶-灵芝酸负载于水凝胶系统中, 其中 CQD 发挥示踪水凝胶的作用。Rahiminezhad 等<sup>[47]</sup>

开发出一种新颖的纳米复合材料, 该材料结合了石墨烯量子点 (graphene quantum dots, GQDs) 和 PLGA, GQD 凭借其独特的光致发光特性而被用作荧光探针, 以实现药物递送过程的精确追踪, 进而优化索拉非尼的药物递送效果。

CQDs 具有非常稳定的荧光特性, 使其在长时间或复杂环境下仍能保持较高的信号强度。目前 CQDs 的荧光发光波长多为蓝绿色 (400~520 nm), 多需要紫外光波激发, 存在生物组织穿透深度低、易造成生物组织光损伤的缺点。

### 1.3 酶联免疫吸附测定技术

酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是一种经典的生物分析技术, 其基于抗原与抗体之间的特异性结合。当一种特定的抗原被加入到样品板的小孔中时, 可与相应的抗体结合。这种结合可通过添加酶标记的二抗来检测, 该酶可催化一种底物产生颜色、荧光或其他可检测的信号。邓雪等<sup>[48]</sup>利用 ELISA 技术, 对尿酸酶和尿酸酶脂质体在大鼠体内的药代动力学行为进行比较, 结果显示, 尿酸酶脂质体组的大鼠体内尿酸酶活性更高, 且半衰期更长。ELISA 具有高灵敏度、高通量的优点, 但使用该方法需要针对每种待测物开发特异性的抗体与检测条件, 不仅操作繁琐, 且成本高昂。此外, ELISA 作为间接检测技术, 其选择性、

动态范围往往不尽如人意<sup>[49]</sup>。近年来, 直接利用 ELISA 技术对 NDDSs 进行体内分析的研究相对较少, 这可能是因为 NDDSs 的复杂性与多样性使得开发通用的 ELISA 检测方法变得困难。

#### 1.4 抗聚乙二醇单链可变片段抗体技术

复旦大学占昌友教授课题组开发了一种利用抗 PEG 单链可变片段抗体 (anti-PEG single chain variable fragment antibody, PEG-scFv) 来分离 PEG 化脂质体的技术<sup>[50]</sup>。scFv 是一类具有小相对分子质量和高抗原结合活性的抗体片段<sup>[51]</sup>, 因其无 Fc 片段, 在纳米药物表面吸附后, scFv 不会引起补体激活<sup>[52-53]</sup>。PEG-scFv 与 PEG 化脂质体表面的 PEG 结合后, 能

够引起 PEG 化脂质体的沉淀, 通过低速离心, 易于将沉淀的脂质体与上清液中的游离型药物分离, 进而对二者进行后续的定量分析 (见图 3)。此外, 这项技术也被证明能够用于分离血浆中的 PEG 化聚合物胶束, 从而实现了紫杉醇胶束的稳定性和体内命运的解析<sup>[54]</sup>。

PEG-scFv 专门针对 PEG 分子, 具有很高的结合特异性, 且这种结合不会导致药物载体中的药物泄漏, 确保了该分离方法的准确性和效率。因许多纳米药物均使用 PEG 来增加溶解性、稳定性或减少免疫原性, 该技术对于其他种类的 PEG 化纳米药物也具有很好的应用潜能。

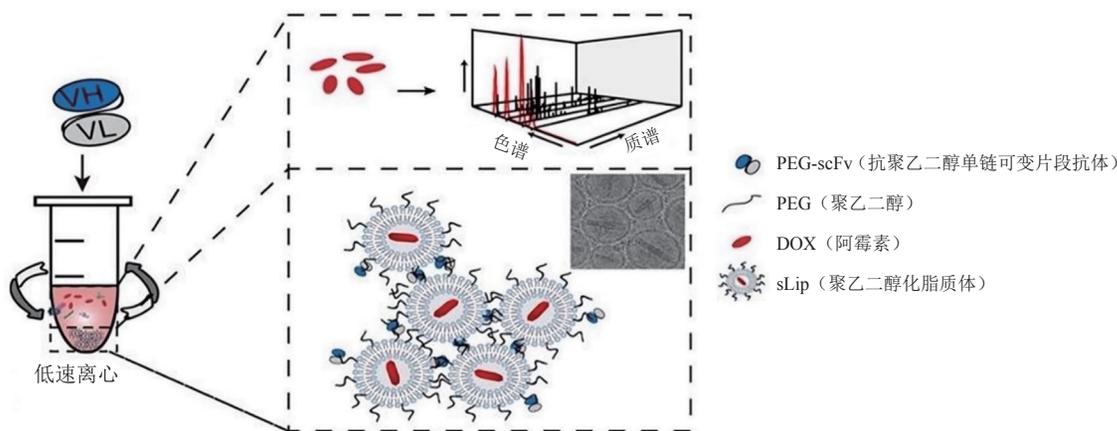


图 3 基于抗 PEG 单链可变片段抗体 (PEG-scFv) 方法分离释放的 DOX 和脂质体 DOX 的示意图<sup>[50]</sup>

Figure 3 Schematic illustration of the separation of released DOX and liposomal DOX by PEG-scFv based method

#### 1.5 稳定同位素示踪超滤技术

超滤是一种膜分离技术, 主要用于大分子和小分子的分离。超滤法主要依赖于半透膜的微孔结构。当溶液在外界压力作用下流经超滤膜表面时, 小于膜孔径的小分子透过膜, 而大于膜孔径的物质被截留。对于纳米药物, 在超滤过程中存在一个重要的问题, 即血浆蛋白结合的药物成分对负载型药物定量准确性的影响<sup>[55]</sup>。Stem 团队开发了稳定同位素示踪超滤 (stable isotope tracer ultrafiltration assay, SITUA) 技术, 通过将稳定同位素示踪剂加入到含有纳米药物的血浆样本中, 对传统的超滤方法进行改进, 从而能够更准确地评估血浆蛋白的结合情况<sup>[56]</sup>。SITUA 假设同位素标记的药物与从纳米药物中释放的药物具有相同的蛋白结合行为。该具体过程为: 首先将同位素标记的药物 ( $D^*$ )

加入到含有纳米药物的血浆中,  $D^*$  会迅速与血浆蛋白达到结合平衡; 然后将血浆样本转移到超滤装置中并通过离心分离, 分别检测血浆样本中  $D^*$  的总浓度 [Total  $D^*$ ]、超滤液中  $D^*$  的浓度 [Ultrafiltrate  $D^*$ ]、血浆样本中非同位素标记药物 ( $D$ ) 的总浓度 [Total  $D$ ] 以及超滤液中  $D$  的浓度 [Ultrafiltrate  $D$ ]。通过图 4 中的公式 (1) 计算  $D^*$  的蛋白结合率 (%Bound  $D^*$ )。由于  $D$  与  $D^*$  具有相同的血浆蛋白结合行为, 因此  $D$  的血浆蛋白结合率等于  $D^*$  的血浆蛋白结合率。根据图 4 中的公式 (2) 计算游离型药物的浓度 [Unencapsulated  $D$ ]。确定了 %Bound  $D^*$  和 [Unencapsulated  $D$ ] 后, 可以使用图 4 中的公式 (3) 计算蛋白结合型  $D$  的浓度 [Protein-bound  $D$ ], 并使用图 4 中的公式 (4) 计算负载型药物的浓度 [Encapsulated  $D$ ]<sup>[55]</sup>。

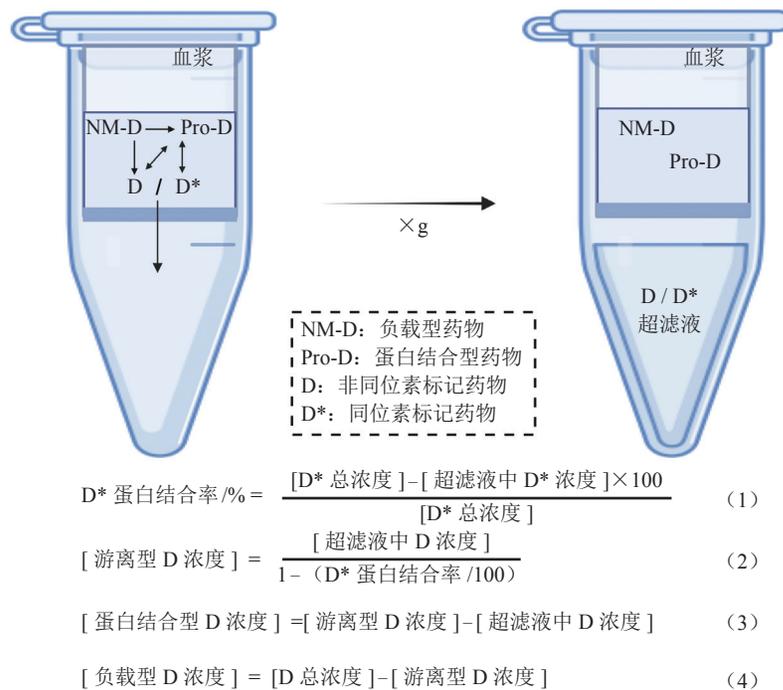


图 4 稳定同位素示踪超滤技术概览

Figure 4 Schematic illustration of the stable isotope tracer ultrafiltration assay (SITUA) technique

SITUA 技术已被用来研究白蛋白结合型紫杉醇 Abraxane<sup>®</sup> 及紫杉醇聚合物胶束制剂 Genexol<sup>®</sup>PM 在大鼠中的药代动力学特征, 并进行了生物等效性评价。该研究结果发现, 尽管 Abraxane<sup>®</sup> 和 Genexol<sup>®</sup>PM 的总药物、游离型药物的浓度-时间曲线几乎相同, 但 2 种制剂游离型药物的药代动力学参数具有显著的统计学差异, 而总药物无此差异<sup>[57-58]</sup>。这也再次证明了只关注总药物浓度的传统分析方法的局限性。

利用 SITUA 技术可以获得血浆样本中的负载型药物、蛋白结合药物和游离型药物的浓度信息。然而, SITUA 技术是基于稳定同位素标记药物和从纳米药物中释放的药物具有相同血浆蛋白结合行为的假设。实际上, 血浆中释放药物的浓度范围较宽, 不同浓度下药物的蛋白结合率可能会发生变化, 从而导致潜在的准确性问题。因此, 在使用此方法之前, 需要检验不同浓度下药物的血浆蛋白结合率是否一致。此外, 超滤装置的非特异性吸附问题也需要注意。

### 1.6 磁共振成像技术

磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 是一种无创成像技术, 具有高分辨率与深组织穿

透能力, 能够精确捕捉到纳米载体在体内的动态变化<sup>[8]</sup>。

氧化铁纳米粒 (iron oxide nanoparticle, IONP) 由于其独特的磁性和良好的生物相容性被广泛用作 MRI 造影剂<sup>[59]</sup>。Stater 等<sup>[60]</sup> 将免疫佐剂单磷酸脂质 A (monophosphoryl lipid A, MPLA) 装载到纳米氧化铁粒菲立莫妥 (ferumoxytol, FH) 的碳水化合物外壳中, 形成 FH-MPLA 复合物。随后, 将 FH-MPLA 通过静脉注射到小鼠体内。FH 作为纳米载体, 能够将药物有效地递送至肿瘤细胞, 同时也作为 MRI 造影剂, 可通过无创成像技术实时监测纳米载体的体内分布。Zhou 等<sup>[61]</sup> 设计并合成了一种装载有金丝桃素的锰基树枝状聚合物纳米粒 (manganese-based and hypericin-loaded polyester dendrimer nanoparticle, MHD), 当 MHD 到达肿瘤部位时, MHD 可被肿瘤细胞内化并降解释放出金丝桃素和锰离子。锰离子一方面具有优异的 MRI 成像性能, 另一方面可通过将内源性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 转化为毒性羟基自由基, 从而强化金丝桃素的光动力治疗过程。MHD 整体显示出良好的成像能力与治疗效果。

MRI 技术能够提供高分辨率的三维成像, 这对

于纳米载体在体内的行为和分布的研究至关重要。MRI 技术和相关纳米载体的研究涉及复杂的物理学、化学和生物学问题, 需要跨学科的知识和技术, 涉及材料科学、生物医学工程、药学等多个领域。MRI 设备及维护成本高昂, 对于初期纳米载体的研究和开发造成较高的经济压力。另外, 不是所有的纳米材料均适合作为 MRI 造影剂, 需要具有特定的磁学性质, 这进一步限制了 MRI 的应用范围。

## 2 载体材料分析技术

纳米载体依赖载体材料来维持其结构, 从而实现药物递送与控制释放的目的。载体材料不仅能够影响其所负载药物的药代动力学过程, 导致药效和毒副作用的改变, 也能通过影响机体免疫、代谢等过程, 产生新的毒副作用。因此, 阐释载体材料的体内命运对于评估 NDDSs 的安全性具有重要意义。纳米载体包括有机载体和无机载体。尽管无机载体相关报道很多, 但在生物相容性、生物降解性及载药性能等方面有机载体优于无机载体。目前, 绝大多数已上市或处于临床阶段的纳米载体均基于有机载体。由于有机载体的组成材料具有生物降解性, 其降解产物较为复杂, 且检测过程易受生物基质的干扰。有机载体材料多为高分子聚合物, 通常具有多分散的性质, 不同相对分子质量的同系物组成和比例千变万化, 因此其体内定性、定量分析均具有很大的挑战。下文将对常用的纳米载体材料分析技术进行介绍。

### 2.1 液相色谱-串联质谱技术

近几十年来 LC-MS/MS 技术的发展令人瞩目, 不仅在小分子药物的定量分析中展现出高灵敏度, 还在大分子如蛋白质的定量生物分析中逐渐获得更多关注。LC-MS/MS 技术具有优异的选择性、良好的准确度与精密度以及更宽的动态范围<sup>[62]</sup>, 使得其在分析复杂生物基质中的待测物时具有更高的可靠性。

小分子纳米载体材料相对分子质量固定, 采用基于多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描模式的传统 LC-MS/MS 技术即可实现其在生物样品中的定量分析, 这已是成熟技术体系。

然而纳米载体材料多数为高分子聚合物, 相对分子质量呈多分散性, 在电喷雾质谱中离子化后会形成多电荷离子, 进而产生大量的前体离子。上述生物样品定量分析常用的 MRM 扫描模式, 因其分辨率和扫描速度的局限, 无法全面采集到聚合物的质谱信息, 导致无法精准分析聚合物纳米材料。Zhou 等<sup>[63]</sup>开发了一种基于 MS<sup>ALL</sup> 采集模式的 LC-MS/MS 技术。该技术采用信息独立采集方式, 允许所有 PEG 前体离子通过质谱第一个四极杆并进入碰撞池, 在碰撞池通过施加适当的碰撞能量从而裂解产生 PEG 特异性碎片, 利用 PEG 特异性碎片实现对具有多分散相对分子质量和众多前体离子的 PEG 的绝对定量分析 (见图 5)。该项技术的主要优势包括能够全面分析聚合物, 具有出色的特异性、高灵敏度和可重复性。基于该技术, Meng 等<sup>[64]</sup>研究了两嵌段共聚物单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸 [monomethoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(D, L-lactic acid), PEG-PLA] 的大鼠体内命运, 包括大鼠静脉注射后的药代动力学、生物分布、代谢和排泄情况。该研究结果表明, PEG-PLA 原形主要分布在脾脏、肝脏和肾脏, 主要通过尿液排泄, 其中超过 80% 以代谢物 PEG 排出。Ren 等<sup>[65]</sup>使用该技术研究了 D- $\alpha$ -生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS) 及其代谢物 PEG1000 在大鼠口服和静脉注射后的药代动力学、组织分布和排泄情况, 还考察了 TPGS 与人肝微粒体中细胞色素 P450 的相互作用。

### 2.2 放射性同位素标记技术

使用放射性同位素标记技术, 能够在体内对纳米材料和载体进行示踪, 从而定量研究其生物分布与清除过程<sup>[66-67]</sup>, 进而评估纳米药物的治疗潜力。

Anane-Adjei 等<sup>[68]</sup>制备了一种经 <sup>89</sup>Zr 标记的超支化聚 N-(2-羟丙基) 甲基丙烯酰胺 [hyperbranched N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide, HPMA] 聚合物, 并将其静脉注射到小鼠体内, 随后利用正电子发射断层扫描-计算机断层扫描 (positron emission tomography-computed tomography, PET-CT) 成像技术来监测聚合物在小鼠体内的实时生物分布。Imlimthan 等<sup>[69]</sup>开发了一种 <sup>177</sup>Lu 标记的载有维罗非尼的纤

纤维素纳米晶 (cellulose nanocrystal, CNC) 颗粒, 并通过单光子发射计算机断层成像术 (single-photon emission computed tomography, SPECT) 对  $^{177}\text{Lu}$ -CNC 在肺转移性黑色素瘤小鼠的体内命运进行了示踪。该研究结果显示, 随着孵育时间的延长,  $^{177}\text{Lu}$ -CNC 在

肿瘤细胞内的放射性增高, 而在 48 h 后放射性降低。

放射性同位素示踪剂为医学领域提供了强大的监测工具。然而, 放射性同位素示踪剂也存在一些不可忽视的缺点, 主要集中在成本、安全性以及同位素标记脱落对结果准确性的影响等。

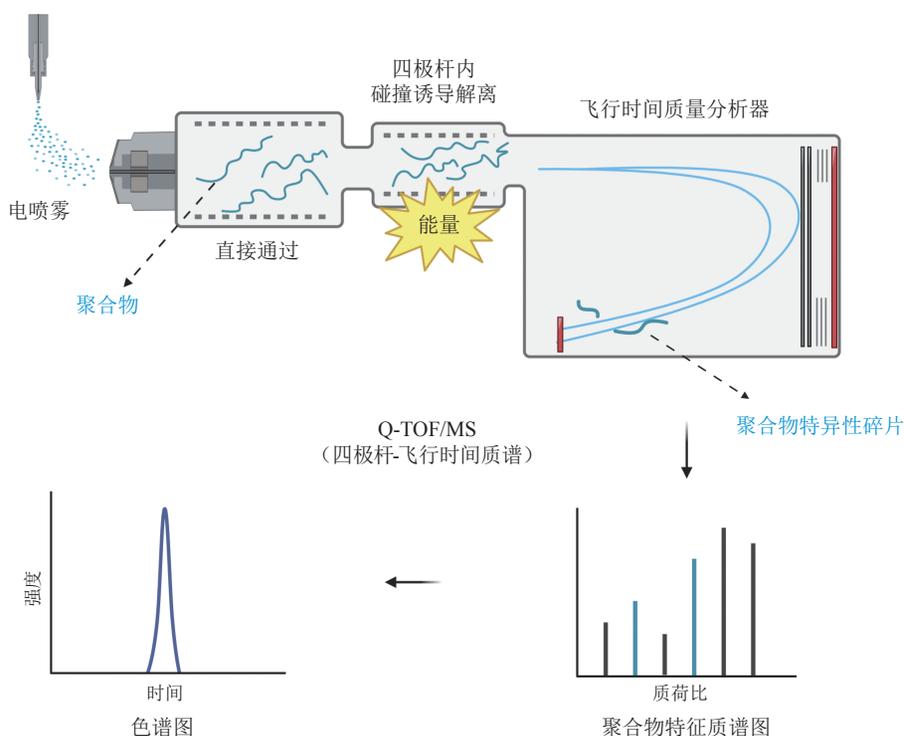


图 5 基于  $\text{MS}^{\text{ALL}}$  技术的聚合物定量分析示意图

Figure 5 Schematic illustration of polymer analysis based on  $\text{MS}^{\text{ALL}}$  technique

### 2.3 同步辐射 X 射线技术

同步辐射 X 射线技术, 凭借其高灵敏度和空间分辨率来研究纳米材料的电子配置、配位几何或氧化状态的能力, 已被用于分析纳米材料的体内行为<sup>[70]</sup>。Yao 等<sup>[71]</sup>研究了  $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$  在巨噬细胞中的分布情况, 发现  $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$  主要分布在溶酶体中。该技术还可以提供高分辨率的三维亚细胞定位, 观察纳米材料在完整细胞中的位置。此外, 该技术可根据  $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$  的密度和分布情况指征纳米材料在 3 种不同类型的溶酶体中的细胞内转运情况。同样, 具有足够样品穿透力的纳米尺度三维成像在研究细胞内纳米材料的分布方面起重要作用, 其能够将细胞内纳米材料的积累情况可视化, 提供了进一步研究其生物转化行为的新方向。

### 3 结语与展望

过去几十年 NDDSs 的研发投入巨大, 但仅有数十个产品上市, 这在很大程度上可能归因于对 NDDSs 的体内命运缺乏最基本的认知。NDDSs 在复杂生命体系中不仅存在多种形态成分, 且多种形态成分之间始终处于动态平衡之中, 给其体内命运研究带来极大的技术挑战。本文对近年来用于追踪 NDDSs 体内命运的分析技术进行了综述, 希望能够为 NDDSs 的体内命运研究提供技术参考。

尽管 NDDSs 体内命运的分析技术已取得一定进展, 但仍面临诸多挑战, 如检测的分辨率、灵敏度和特异性等方面仍有待提高。此外, 目前对 NDDSs 体内命运的研究仍主要依赖单一技术或方法, 缺乏多种技术综合应用以对其进行系统性研究。质谱具

备同时检测药物、载体材料及其代谢物的能力, 且具有高灵敏度和高特异性的优势。通过将质谱技术与操作简便、条件温和、分离高效的新型分离技术结合, 有可能在同时定量纳米药物的游离型药物、负载型药物、纳米载体和纳米材料方面进一步取得进展。多种成像技术如同步辐射光源、MRI、荧光成像的结合, 有望实现优势互补, 从而精准、实时、动态地观察纳米药物在体内的分布和代谢过程, 并从不同角度揭示纳米药物的生物分布和作用机制, 最终获得更全面、更准确的纳米药物体内命运信息。

随着纳米药物体内命运研究的不断深入, 研究纳米药物与不同类型细胞(如肿瘤细胞、免疫细胞、内皮细胞等)之间的相互作用, 分析纳米药物在细胞内的分布和运动轨迹, 探讨纳米药物与生物大分子之间的相互作用, 深化对纳米药物与体内系统相互作用的理解。为实现这些目标, 需要克服更多技术挑战, 探索和发展更为高效、灵敏和精准的分析新技术, 从而更加全面、深入地揭示 NDDSs 的体内命运, 更高效地推动纳米药物的设计与优化, 最终实现纳米药物在临床应用中的疗效最大化与毒副作用最小化。

### 【参考文献】

- [1] Zingg R, Fischer M. The consolidation of nanomedicine[J]. *Wires Nanomed Nanobi*, 2019, 11(6): e1569. DOI: 10.1002/wnan.1569.
- [2] Jia Y, Jiang Y, He Y, *et al.* Approved nanomedicine against diseases[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 774. DOI: 10.3390/pharmaceutics15030774.
- [3] Greish K, Mathur A, Bakhiet M, *et al.* Nanomedicine: is it lost in translation?[J]. *Ther Deliv*, 2018, 9(4): 269–285.
- [4] 国家药品监督管理局药品审评中心. 纳米药物非临床药代动力学研究技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2021-08-27)[2024-06-24]. <https://www.cde.org.cn/zdzy/domesticinfopage?zdyzIdCODE=f2b4f158fd2fb2e2d288a6f1f2759f3>.
- [5] 国家药品监督管理局药品审评中心. 脂质体药物质量控制研究技术指导原则[EB/OL]. (2023-10-19)[2024-06-24]. <https://www.cde.org.cn/zdzy/domesticinfopage?zdyzIdCODE=99196333e688523de419ea2ff74910c2>.
- [6] Bernal A, Calcagno C, Mulder W J M, *et al.* Imaging-guided nanomedicine development[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2021, 63: 78–85. DOI: 10.1016/j.cbpa.2021.01.014.
- [7] Hyldbakk A, Hansen T, Hak S, *et al.* Polyethylene glycol (PEG) as a broad applicability marker for LC-MS/MS-based biodistribution analysis of nanomedicines[J]. *J Control Release*, 2024, 366: 611–620. DOI: 10.1016/j.jconrel.2024.01.016.
- [8] Li P, Wang D, Hu J, *et al.* The role of imaging in targeted delivery of nanomedicine for cancer therapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 189: 114447. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114447.
- [9] Liu W, Ma Z, Wang Y, *et al.* Multiple nano-drug delivery systems for intervertebral disc degeneration: current status and future perspectives[J]. *Bioact Mater*, 2023, 23: 274–299. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.11.006.
- [10] Zong T X, Silveira A P, Morais J A V, *et al.* Recent advances in antimicrobial nano-drug delivery systems[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2022, 12(11): 1855. DOI: 10.3390/nano12111855.
- [11] Lasic D D. Novel applications of liposomes[J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16(7): 307–321.
- [12] Yang B, Song B P, Shankar S, *et al.* Recent advances in liposome formulations for breast cancer therapeutics[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(13): 5225–5243.
- [13] Gao Y, Liu X, Chen N, *et al.* Recent advance of liposome nanoparticles for nucleic acid therapy[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(1): 178. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010178.
- [14] Wang H, Zheng M, Gao J, *et al.* Uptake and release profiles of PEGylated liposomal doxorubicin nanoparticles: a comprehensive picture based on separate determination of encapsulated and total drug concentrations in tissues of tumor-bearing mice[J]. *Talanta*, 2020, 208: 120358. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120358.
- [15] Wang B, Liu S, Liu X, *et al.* Aggregation-induced emission materials that aid in pharmaceutical research[J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(24): e2101067. DOI: 10.1002/adhm.202101067.
- [16] Chen Y, He Q, Lu H, *et al.* Visualization and correlation of drug release of risperidone/clozapine microspheres *in vitro* and *in vivo* based on FRET mechanism[J]. *Int J Pharm*, 2024, 653: 123885. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2024.123885.
- [17] Zhang G, Wang Y, Zhang Z, *et al.* FRET imaging revealed that nanocrystals enhanced drug oral absorption by dissolution rather than

- endocytosis: a case study of coumarin 6[J]. *J Control Release*, 2021, 332: 225–232. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.02.025.
- [18] Sinani G, Durgun M E, Cevher E, *et al.* Polymeric-micelle-based delivery systems for nucleic acids[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(8): 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics15082021.
- [19] Jin G W, Rejinold N S, Choy J H. Multifunctional polymeric micelles for cancer therapy[J]. *Polymers (Basel)*, 2022, 14(22): 4839. DOI: 10.3390/polym14224839.
- [20] Xu Y, Liang N, Liu J, *et al.* Design and fabrication of chitosan-based AIE active micelles for bioimaging and intelligent delivery of paclitaxel[J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 290: 119509. DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.119509.
- [21] Sun C, Lu J, Wang J, *et al.* Redox-sensitive polymeric micelles with aggregation-induced emission for bioimaging and delivery of anticancer drugs[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 14. DOI: 10.1186/s12951-020-00761-9.
- [22] Zhang X, Li X, Hua H, *et al.* Cyclic hexapeptide-conjugated nanoparticles enhance curcumin delivery to glioma tumor cells and tissue[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 5717–5732. DOI: 10.2147/IJN.S138501.
- [23] Wang R, Zou L, Yi Z, *et al.* PLGA nanoparticles loaded with curcumin produced luminescence for cell bioimaging[J]. *Int J Pharm*, 2023, 639: 122944. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.122944.
- [24] Wang Y F, Zhang C, Yang K, *et al.* Transportation of AIE-visualized nanoliposomes is dominated by the protein corona[J]. *Natl Sci Rev*, 2021, 8(6): nwab068. DOI: 10.1093/nsr/nwab068.
- [25] Kulkarni B, Qutub S, Ladelta V, *et al.* AIE-based fluorescent triblock copolymer micelles for simultaneous drug delivery and intracellular imaging[J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22(12): 5243–5255.
- [26] Fu Y, Shi C, Li X, *et al.* Demonstrating biological fate of nanoparticle-loaded dissolving microneedles with aggregation-caused quenching probes: influence of application sites[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(1): 169. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010169.
- [27] Ji X, Cai Y, Dong X, *et al.* Selection of an aggregation-caused quenching-based fluorescent tracer for imaging studies in nano drug delivery systems[J]. *Nanoscale*, 2023, 15(21): 9290–9296.
- [28] Yang J, Dong Z, Liu W, *et al.* Discriminating against injectable fat emulsions with similar formulation based on water quenching fluorescent probe[J]. *Chin Chem Lett*, 2020, 31(3): 875–879.
- [29] He H, Jiang S, Xie Y, *et al.* Reassessment of long circulation via monitoring of integral polymeric nanoparticles justifies a more accurate understanding[J]. *Nanoscale Horiz*, 2018, 3(4): 397–407.
- [30] Liu D, Wan B, Qi J, *et al.* Permeation into but not across the cornea: bioimaging of intact nanoemulsions and nanosuspensions using aggregation-caused quenching probes[J]. *Chin Chem Lett*, 2018, 29(12): 1834–1838.
- [31] Ahmad E, Feng Y, Qi J, *et al.* Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: cargoes but not vehicles[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(3): 1174–1183.
- [32] He H, Zhang J, Xie Y, *et al.* Bioimaging of intravenous polymeric micelles based on discrimination of integral particles using an environment-responsive probe[J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(11): 4013–4019.
- [33] Fan W, Yu Z, Peng H, *et al.* Effect of particle size on the pharmacokinetics and biodistribution of parenteral nanoemulsions[J]. *Int J Pharm*, 2020, 586: 119551. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119551.
- [34] He H, Wang L, Ma Y, *et al.* The biological fate of orally administered mPEG-PDLLA polymeric micelles[J]. *J Control Release*, 2020, 327: 725–736. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.09.024.
- [35] Wu W, Ding Q, Zhou Z, *et al.* Transcellular transport behavior of the intact polymeric mixed micelles with different polymeric ratios[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2023, 24(2): 69. DOI: 10.1208/s12249-022-02454-y.
- [36] Jiang Y, Jiang Y, Ding Z, *et al.* Investigation of the "nose-to-brain" pathways in intranasal HupA nanoemulsions and evaluation of their *in vivo* pharmacokinetics and brain-targeting ability[J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 3443–3456. DOI: 10.2147/IJN.S369978.
- [37] Naghibi S, Sabouri S, Hong Y, *et al.* Brush-like polymer prodrug with aggregation-induced emission features for precise intracellular drug tracking[J]. *Biosensors (Basel)*, 2022, 12(6): 373. DOI: 10.3390/bios12060373.
- [38] Tengjisi, Liu Y, Zou D, *et al.* Bioinspired core-shell silica nanoparticles monitoring extra- and intra-cellular drug release[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2022, 624: 242–250. DOI: 10.1016/j.jcis.2022.05.099.
- [39] Yang G, Liu Y, Teng J, *et al.* FRET ratiometric nanoprobe for nanoparticle monitoring[J]. *Biosensors (Basel)*, 2021, 11(12): 505.

- DOI: 10.3390/bios11120505.
- [40] Kaeokhamloed N, Legeay S, Roger E. FRET as the tool for *in vivo* nanomedicine tracking[J]. *J Control Release*, 2022, 349: 156–173. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.06.048.
- [41] Zhong J, Quan Y, Zhao X, *et al.* Coassembling functionalized glycopolypeptides to prepare pH-responsive self-indicating nanocomplexes to manipulate self-assembly/drug delivery and visualize intracellular drug release[J]. *Biomater Adv*, 2022, 134: 112711. DOI: 10.1016/j.msec.2022.112711.
- [42] Laskar P, Dhasmana A, Kotnala S, *et al.* Glutathione-responsive tannic acid-assisted FRET nanomedicine for cancer therapy[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(5): 1326. DOI: 10.3390/pharmaceutics15051326.
- [43] Zhou Z, Wang Y, Hu P. Oxidation-responsive micelles for drug release monitoring and bioimaging of inflammation based on FRET effect *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 2447–2457. DOI: 10.2147/IJN.S356202.
- [44] Hollis C P, Weiss H L, Leggas M, *et al.* Biodistribution and bioimaging studies of hybrid paclitaxel nanocrystals: lessons learned of the EPR effect and image-guided drug delivery[J]. *J Control Release*, 2013, 172(1): 12–21.
- [45] Pelaz B, Alexiou C H, Alvarez-Puebla R A, *et al.* Diverse applications of nanomedicine[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(3): 2313–2381.
- [46] Mazandarani A, Taravati A, Mohammadnejad J, *et al.* Targeted anticancer drug delivery using chitosan, carbon quantum dots, and aptamers to deliver ganoderic acid and 5-fluorouracil[J]. *Chem Biodivers*, 2023, 20(9): e202300659. DOI: 10.1002/cbdv.202300659.
- [47] Rahiminezhad Z, Tamaddon A, Dehshanri A, *et al.* PLGA-graphene quantum dot nanocomposites targeted against  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptor for sorafenib delivery in angiogenesis[J]. *Biomater Adv*, 2022, 137: 212851. DOI: 10.1016/j.bioadv.2022.212851.
- [48] 邓雪, 何丹, 熊华蓉, 等. 静脉注射尿酸酶多囊脂质体的药代动力学和药效学研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2015, 46(5): 688–691.
- [49] Iwamoto N, Koguchi Y, Yokoyama K, *et al.* A rapid and universal liquid chromatograph-mass spectrometry-based platform, refmAb-Q nSMOL, for monitoring monoclonal antibody therapeutics[J]. *Analyst*, 2022, 147(19): 4275–4284.
- [50] Tang W, Zhang Z, Li C, *et al.* Facile separation of PEGylated liposomes enabled by anti-PEG scFv[J]. *Nano Lett*, 2021, 21(23): 10107–10113.
- [51] Du J, Cao Y, Liu Y, *et al.* Engineering bifunctional antibodies with constant region fusion architectures[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(51): 18607–18615.
- [52] Safdari Y. Engineering of single chain antibodies for solubility[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 86–97. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.11.046.
- [53] Shimizu T, Mima Y, Hashimoto Y, *et al.* Anti-PEG IgM and complement system are required for the association of second doses of PEGylated liposomes with splenic marginal zone B cells[J]. *Immunobiology*, 2015, 220(10): 1151–1160.
- [54] Lin S, Yu Y, Wu E, *et al.* Reexamining *in vivo* fate of paclitaxel-loaded polymeric micelles[J]. *Nano Today*, 2024, 56: 102255. DOI: 10.1016/j.nantod.2024.102255.
- [55] Skoczen S L, Stern S T. Improved ultrafiltration method to measure drug release from nanomedicines utilizing a stable isotope tracer[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1682: 223–239. DOI: 10.1007/978-1-4939-7352-1\_19.
- [56] Skoczen S, McNeil S E, Stern S T. Stable isotope method to measure drug release from nanomedicines[J]. *J Control Release*, 2015, 220: 169–174. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.042.
- [57] Skoczen S L, Snapp K S, Crist R M, *et al.* Distinguishing pharmacokinetics of marketed nanomedicine formulations using a stable isotope tracer assay[J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, 3(3): 547–558.
- [58] Hwang D, Vinod N, Skoczen S L, *et al.* Bioequivalence assessment of high-capacity polymeric micelle nanoformulation of paclitaxel and Abraxane<sup>®</sup> in rodent and non-human primate models using a stable isotope tracer assay[J]. *Biomaterials*, 2021, 278: 121140. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121140.
- [59] Zhao Z, Li M, Zeng J, *et al.* Recent advances in engineering iron oxide nanoparticles for effective magnetic resonance imaging[J]. *Bioact Mater*, 2022, 12: 214–245. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.10.014.
- [60] Stater E P, Morcos G, Isaac E, *et al.* Translatable drug-loaded iron oxide nanopore sensitizes murine melanoma tumors to monoclonal antibody immunotherapy[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(7): 6178–6192.
- [61] Zhou X, Xu X, Hu Q, *et al.* Novel manganese and polyester dendrimer-based theranostic nanoparticles for MRI and breast cancer

- therapy[J]. *J Mater Chem B*, 2023, 11(3): 648–656.
- [62] Kusuma M B, Kashibhatta R, Jagtap S S, *et al.* A selective and sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for quantification of pegylated interferon  $\alpha$ -2b in human serum using signature peptide-based quantitation[J]. *J Chromatogr B*, 2022, 1192: 123159. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123159.
- [63] Zhou X, Meng X, Cheng L, *et al.* Development and application of an MSALL-based approach for the quantitative analysis of linear polyethylene glycols in rat plasma by liquid chromatography triple-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(10): 5193–5200.
- [64] Meng X, Zhang Z, Tong J, *et al.* The biological fate of the polymer nanocarrier material monomethoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(D, L-lactic acid) in rat[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(4): 1003–1009.
- [65] Ren T, Li R, Zhao L, *et al.* Biological fate and interaction with cytochromes P450 of the nanocarrier material, D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(7): 3156–3166.
- [66] Wang T, Zhang D, Sun D, *et al.* Current status of *in vivo* bioanalysis of nano drug delivery systems[J]. *J Pharm Anal*, 2020, 10(3): 221–232.
- [67] Lammers T, Aime S, Hennink W E, *et al.* Theranostic nanomedicine[J]. *Acc Chem Res*, 2011, 44(10): 1029–1038.
- [68] Anane-Adjei A B, Fletcher N L, Cavanagh R J, *et al.* Synthesis, characterisation and evaluation of hyperbranched *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamides for transport and delivery in pancreatic cell lines *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biomater Sci*, 2022, 10(9): 2328–2344.
- [69] Imlimthan S, Khng Y C, Keinänen O, *et al.* A theranostic cellulose nanocrystal-based drug delivery system with enhanced retention in pulmonary metastasis of melanoma[J]. *Small*, 2021, 17(18): e2007705. DOI: 10.1002/sml.202007705.
- [70] Zhu S, Wang Y, Chen C. *In situ* analysis of the fate and behavior of inorganic nanomaterials in biological systems by synchrotron radiation X-ray probe techniques[J]. *Curr Anal Chem*, 2022, 18(6): 723–738.
- [71] Yao S, Fan J, Chen Z, *et al.* Three-dimensional ultrastructural imaging reveals the nanoscale architecture of mammalian cells[J]. *IUCrJ*, 2018, 5: 141–149. DOI: 10.1107/S2052252517017912.



**【专家介绍】**顾景凯：吉林大学唐敖庆卓越教授、药物代谢研究中心主任，超分子结构与材料国家重点实验室教授，国家药品注册审评专家咨询委员会专家。中国药理学学会药物代谢专业委员会副主委、分析药理专业委员会副主委；中国医药生物技术协会药物分析技术分会副主委；《药学报》副主编；*Drug Metab Dispos*, *Acta Pharm Sin B*, *Asian J Pharm Sci*, *J Pharm Anal* 等期刊编委。

长期从事纳米药物、高分子药物、多糖药物、蛋白肽类药物体内时空命运分析和基于药代动力学的前体药物设计与开发。先后主持 11 项国家自然科学基金面上项目、重点项目和国家重大新药创制专项子课题，在 *Adv Drug Deliv Rev*, *Anal Chem*, *Acta Pharm Sin B*, *Adv Mater*, *Biomacromolecules*, *Clin Pharmacokinet* 等期刊发表 SCI 论文 200 余篇，获授权发明专利 15 项，作为主要发明人之 1 类新药于 2022 年上市。