

化疗-光热治疗-自促进饥饿治疗纳米治疗平台的构筑及对乳腺癌的治疗效果

马爽¹, 吕明杨¹, 张赐童², 刘轶¹

(1. 吉林大学化学学院, 超分子结构与材料国家重点实验室, 长春 130012;
2. 吉林大学口腔医院综合口腔治疗科, 长春 130012)

摘要 近年来, 随着纳米技术的不断发展, 多功能纳米复合材料在肿瘤治疗领域得到了广泛应用. 因肿瘤的异质性、复杂性以及多样性的特征, 使得单一的治疗手段很难达到理想的治疗效果. 因此, 将多种治疗方式相结合实现肿瘤的联合治疗成为了研究的热点. 本文设计了一种新型的纳米治疗平台, 在Pt@介孔Au纳米材料(Pt@Au)的表面包覆聚多巴胺(PDA)壳层, 并在PDA壳层中负载阿霉素(DOX), 在PDA壳层表面修饰葡萄糖氧化酶(GOx)和NH₂-PEG_{5k}-cRGD. NH₂-PEG_{5k}-cRGD可以与肿瘤细胞中过表达的 $\alpha v \beta_3$ 整合素特异性结合, 实现纳米治疗平台在肿瘤区域的富集. DOX可以损伤肿瘤细胞的DNA, 用于化学治疗. 介孔Au和PDA优异的光热性能可以用于光热治疗. GOx可以与肿瘤细胞内的葡萄糖反应生成葡萄糖酸和H₂O₂, 实现饥饿治疗. Pt作为常见的类过氧化氢酶可以催化肿瘤细胞内H₂O₂分解生成O₂, 缓解肿瘤缺氧微环境, 促进饥饿治疗. 因此, 制备的Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD具有化疗-光热治疗-自促进饥饿治疗联合治疗肿瘤的能力.

关键词 纳米治疗平台; 化疗; 光热治疗; 饥饿治疗; 乳腺癌

中图分类号 O625.31 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20240467

Construction of Chemotherapy-Photothermal Therapy-Self-enhanced Starvation Therapy Nanoplatfrom and Its Application in Breast Cancer Treatment

MA Shuang¹, LYU Mingyang¹, ZHANG Citong^{2*}, LIU Yi^{1*}

(1. State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials, College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China;
2. Department of Oral Comprehensive Therapy, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract In recent years, with the continuous development of nanotechnology, multifunctional nanocomposites have been widely applied in the field of tumor therapy. Due to the heterogeneity, complexity, and diversity of tumors, single treatment approaches often fail to achieve ideal therapeutic outcomes. Therefore, combining multiple treatment methods to achieve synergistic tumor therapy has become a research hotspot. This paper designs a novel nanotherapy platform. A polydopamine (PDA) shell was coated on the surface of Pt@mesoporous Au nanomaterials

收稿日期: 2024-10-16. 网络首发日期: 2024-11-25.

联系人简介: 刘轶, 男, 博士, 教授, 主要从事聚合物纳米复合材料的诊疗研究. E-mail: yiliuchem@jlu.edu.cn

张赐童, 男, 博士, 主治医师, 主要从事骨代谢及医学材料研究. E-mail: zhangct14@163.com

基金项目: 长春市科技发展计划项目(批准号: 23***13)、国家自然科学基金(批准号: 82301113)、吉林省自然科学基金(批准号: YDZJ202301ZYTS019)和吉林省财政厅卫生人才项目(批准号: jcsz2023481-21)资助.

Supported by the Science and Technology Development Program of Changchun City, China(No.23***13), the National Natural Science Foundation of China(No.82301113), the Natural Science Foundation of Jilin Province, China(No.YDZJ202301ZYTS019) and the Program for Public Health Talents of Jilin Province Department of Finance, China(No.jcsz2023481-21).

(Pt@Au), and doxorubicin (DOX) was loaded into the PDA shell. The surface of the PDA shell was modified with glucose oxidase (GOx) and NH₂-PEG_{5k}-cRGD. NH₂-PEG_{5k}-cRGD can specifically bind to the overexpressed $\alpha\text{v}\beta_3$ integrin in tumor cells, facilitating the accumulation of the nanotherapy platform in the tumor region. DOX can damage the DNA of tumor cells and is used for chemotherapy. The excellent photothermal properties of mesoporous Au and PDA can be used for photothermal therapy. GOx can react with glucose in tumor cells to produce gluconic acid and H₂O₂, achieving starvation therapy. Pt, as a common peroxidase mimic, can catalyze the decomposition of H₂O₂ in tumor cells to generate O₂, alleviating the hypoxic tumor microenvironment and promoting starvation therapy. Therefore, the Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD possesses the ability to perform chemotherapy-photothermal therapy-self-enhanced starvation therapy for combined tumor treatment.

Keywords Nanotherapy platform; Chemotherapy; Photothermal therapy; Starvation therapy; Breast cancer

恶性肿瘤作为一种危害人类生命健康的常见疾病,具有发病率高、难治愈的特点^[1].与正常细胞相比,肿瘤细胞需要大量营养物质来维持快速增殖,因此切断营养物质的供应是抑制肿瘤生长的有效方法^[2].近年来,基于葡萄糖氧化酶(GOx)的新型肿瘤治疗策略受到广泛关注.GOx作为一种氧化还原酶可以在O₂存在下氧化葡萄糖生成葡萄糖酸与H₂O₂,从而消耗肿瘤细胞内部葡萄糖,达到饥饿治疗的效果^[3].但实体瘤内部的乏氧微环境会大大限制饥饿治疗的治疗效果.因此,通过额外的O₂供应来缓解肿瘤乏氧是提高饥饿治疗效果的重要手段^[3-7].目前,常见的缓解肿瘤乏氧的方式主要有:(1)利用全氟化碳或血红蛋白负载O₂,到达肿瘤区域后根据肿瘤区域的氧分压释放O₂^[8].(2)考虑到肿瘤细胞代谢异常产生的高浓度内源性H₂O₂,利用催化剂催化H₂O₂分解生成O₂.如,使用MnO₂和过氧化氢酶等催化剂将肿瘤细胞内的H₂O₂分解为O₂^[9-12].另外,由于肿瘤可以不断地从毛细血管中汲取营养,仅靠饥饿治疗很难完全治愈肿瘤.将饥饿治疗与多种治疗方式(如化学治疗^[13-15]、光热治疗^[16-19]等)相结合是治疗肿瘤的有效方法^[20,21].

因此,本文设计了一种新型的纳米治疗平台,在Pt@介孔Au核壳纳米材料(Pt@Au)的表面包覆聚多巴胺(PDA)壳层,并在PDA壳层中负载阿霉素(DOX),在PDA壳层的表面修饰GOx和NH₂-PEG_{5k}-cRGD.NH₂-PEG_{5k}-cRGD可以与肿瘤细胞中过表达的 $\alpha\text{v}\beta_3$ 整合素特异性结合,实现纳米治疗平台在肿瘤区域的富集.DOX可以损伤肿瘤细胞的DNA,用于化疗.介孔Au和PDA优异的光热性能可以用于光热治疗.GOx可以与肿瘤细胞内的葡萄糖反应生成葡萄糖酸和H₂O₂,实现饥饿治疗.Pt作为常见的类过氧化氢酶可以催化肿瘤细胞内H₂O₂分解生成O₂,缓解肿瘤乏氧微环境,促进饥饿治疗.实验结果表明,制备的Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD具有化疗-光热治疗-自促进饥饿治疗联合治疗肿瘤的能力.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

氯亚铂酸钾(K₂PtCl₄,纯度99.9%)、三水合四氯金酸(HAuCl₄·3H₂O,纯度99.9%)、L-抗坏血酸(纯度99.99%)、十六烷基三甲基溴化铵(纯度99%)、水合肼(NH₂NH₂·xH₂O,纯度24%~26%)、Cyt-C(纯度95%)、苏木精-伊红(H&E)染色液、多巴胺盐酸盐(DA,纯度98%)、盐酸阿霉素(DOX,纯度98%)、葡萄糖氧化酶(GOx,酶活性为50 U/mg)和三(羟甲基)氨基甲基(Tris,纯度99.9%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;氨基-聚乙二醇-环肽cRGD(NH₂-PEG_{5k}-cRGD),西安瑞禧生物科技有限公司;葡萄糖(纯度99.5%),美国西格玛奥德里奇公司;CCK-8,美国Bimake生物科技有限公司;盐酸(HCl,分析纯),广东省西陇科学股份有限公司;C₂₂N-SH(参考文献[22]合成),上海梯希爱化成工业发展有限公司;蛋白标准品Bax(纯度95%)、Bcl-2(纯度95%)和HIF-1 α (纯度95%),北京义翘神州科技股份有限公司;抗Bax抗体(纯度95%)、抗Bcl-2抗体(纯度95%)、抗HIF-1 α 抗体(纯度95%)、抗Cyt-C抗体(纯度95%)和HRP标记的兔抗鼠抗体(纯度95%),上海艾博抗贸易有限公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,纯度99%),上海麦克林生化科技股份有限公司;Click-iT TUNEL检测试剂盒、HIF-1 α 单克隆抗

体(ESEE122)和FITC,美国赛默飞世尔科技公司; Calcein AM、Propidium Iodide、BCECF-AM、过氧化氢检测试剂盒、Hoechst 33342染色液和Bradford蛋白浓度测定试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司; 缺氧/氧化应激试剂盒(ROS-ID),美国Enzo公司; 双染细胞凋亡检测试剂盒[Annexin V-FITC(7-AAD)],天津三箭生物技术股份有限公司; 去离子水(电阻率18.25 MΩ·cm).

JEM-2100F型透射电子显微镜(TEM,加速电压为200 kV),日本JEOL公司; VERTEX 80V型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR),德国Brucker公司; Empyrean型X射线衍射仪(XRD),荷兰帕纳科公司; UV-3600型紫外-可见分光光度计(UV-Vis),日本岛津公司; Agilent 725型电感耦合等离子体光谱仪(ICP-OES),美国安捷伦公司; LE-LS-808-10000TFC型808 nm激光器,深圳市里欧光电科技有限公司; 雷磁JPBJ-608型便携式溶解氧测定仪,上海仪电科学仪器股份有限公司; FV1000型共聚焦显微镜和BX43型荧光显微镜,日本奥林巴斯公司; Infinite 200 PRO型酶标仪,奥地利Infinite公司; Zetasizer-Nano型动态光散射仪,英国马尔文公司.

1.2 实验过程

1.2.1 Pt@Au的制备 参照文献[22]方法进行制备. 首先,合成Pt纳米颗粒:将2.5 mL 0.2 mol/L HCl溶液、3.0 mL 10 mmol/L 氯亚铂酸钾溶液分别加入50 g水中,在75 °C的烘箱中静置30 min,加入新鲜配制的5 mL 40 mg/mL L-抗坏血酸溶液,在烘箱中静置2 h后取出,冷却至室温. 随后,先将120 mg C₂₂N-SH溶解于10 mL水中,和300 mg 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)溶解于40 mL水中,将10 mL HAuCl₄注入到C₂₂N-SH的溶液中,再将CTAB溶液倒入上述混合溶液中,于室温下静置20 min,边搅拌边加入32 mL水合肼溶液和30 mL第一步合成的Pt颗粒的混合溶液,静置30 min,用水离心洗涤3次,则得到Pt@介孔Au的核壳结构.

1.2.2 Pt@Au@PDA-DOX的制备 将1 mL 1 mg/mL Pt@Au溶液稀释至4 mL,在室温搅拌的条件下向其中加入4 mL 1.9 mg/mL DA溶液,即为溶液A. 配制pH为8.5的Tris溶液,将1 mg盐酸阿霉素溶解在9 mL Tris溶液中,即为溶液B. 搅拌的同时将两种溶液混合. 于室温下搅拌24 h,反应结束后,将所得的溶液离心(10000 r/min, 5 min)得到Pt@Au@PDA-DOX.

1.2.3 Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD的制备 将上述所得的Pt@Au@PDA-DOX分散在2 mL去离子水中,即为溶液A. 将2 mg GOx和5 mg NH₂-PEG_{5K}-cRGD溶解在6 mL Tris溶液中,即为溶液B. 将摇床的速度调至400 r/min,在摇床上将溶液B加入到溶液A中. 于室温下反应24 h. 反应结束后,将所得的溶液离心(10000 r/min, 5 min)得到Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD.

1.2.4 Au@PDA-DOX-GOx-cRGD的制备 首先,合成介孔Au:将1.0 mL 10 mmol/L HAuCl₄溶液添加到5 mL 19 mmol/L C₂₂N-SH溶液中. 轻轻摇动,溶液的颜色从黄色变为无色. 将溶液在35 °C下均匀混合30 min后,将6.4 mL N₂H₄注入溶液中,颜色立刻从透明变成了深蓝色. 在35 °C下静置30 min,在体积比为3:1的H₂SO₄/H₂O₂溶液中静置30 min,收集产物并用H₂O洗涤数次. 随后的包覆PDA和药物负载步骤与1.2.2和1.2.3节中相同.

2 结果与讨论

2.1 样品的制备与表征

制备的Pt@介孔Au核壳纳米粒子的尺寸为76 nm[图1(A)],表面电势为21.5 mV[图1(E)],XRD谱图表明Pt@Au具有立方晶相[图1(F)]. Mapping表征结果表明Pt@Au中分布有Au与Pt元素(图S1,见本文支持信息).

对Pt@Au进行PDA的包覆和DOX的负载. 由于DA表面富含酚羟基和胺基,因此在碱性条件下可以聚合形成PDA壳层包覆在Pt@Au的表面(Pt@Au@PDA). DOX可以通过 π - π 堆积以及和PDA之间形成氢键负载在PDA壳层中(Pt@Au@PDA-DOX). 由图1(B)可见, Pt@Au@PDA-DOX的尺寸为106 nm, PDA壳层厚度约15 nm. 包覆PDA后纳米粒子的表面电势为-30.2 mV. 红外光谱显示纳米粒子在3410 cm⁻¹处存在酚羟基和N—H拉伸振动吸收峰,在1038 cm⁻¹处存在C—O伸缩振动吸收峰,说明PDA

的成功包覆以及DOX的成功负载[图1(D)].

由于PDA可以通过迈克尔加成与氨基封端的分子共价连接,因此在PDA壳层外进一步修饰GOx和NH₂-PEG_{5k}-cRGD. TEM照片表明,GOx和NH₂-PEG_{5k}-cRGD的修饰并没有对Pt@Au@PDA-DOX的形貌产生任何影响[图1(C)].但是修饰之后表面电势变为-33.1 mV,对比GOx,DOX,NH₂-PEG_{5k}-cRGD的红外光谱(图S2,见本文支持信息),Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD在1639和1531 cm⁻¹处存在酰胺吸收峰,在1039 cm⁻¹处存在C—O—C伸缩振动峰,这些结果说明GOx和NH₂-PEG_{5k}-cRGD的成功修饰.通过紫外-可见吸收光谱可见,Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD保留了Pt@Au和PDA在近红外区的较强吸收,具有潜在的光热治疗性能(图S3,见本文支持信息).

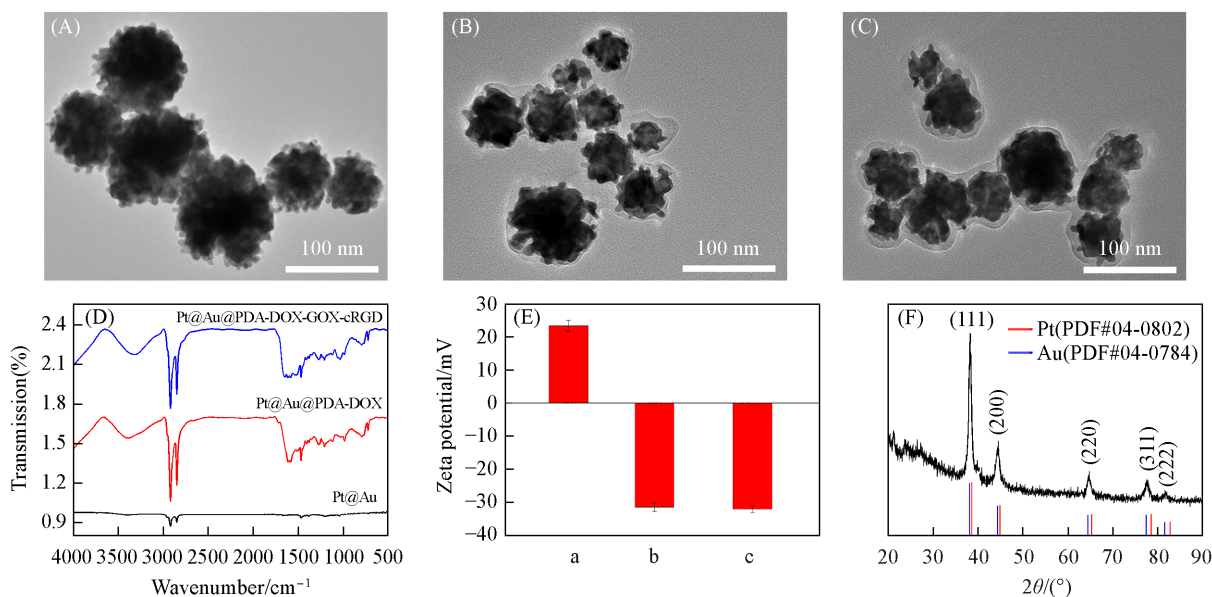


Fig. 1 TEM images of Pt@Au(A), Pt@Au@PDA-DOX(B) and Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD(C), FTIR spectra(D) and zeta potential(E) of Pt@Au, Pt@Au@PDA-DOX and Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD, XRD patterns of Pt@Au(F)

(E) a. Pt@Au; b. Pt@Au@PDA-DOX; c. Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD.

2.2 光热性能

由于Au和PDA壳层具有优异的光热性能,对Pt@Au和Pt@Au@PDA的光热转换性能进行了表征.分别测试了不同浓度(0, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL)的纳米粒子在808 nm激光(1 W/cm²)照射下的温度变化.结果表明,Pt@Au和Pt@Au@PDA的温度均随着纳米粒子浓度的增加而升高[图2(A)和(D)].当纳米粒子浓度为400 μg/mL时,激光照射10 min后Pt@Au和水溶液的温度分别升至39和63 °C.随后,固定纳米粒子浓度为200 μg/mL,分别设定功率为0.5, 1.0和2.0 W/cm²,测试温度的变化.结果表明,随着激光功率的增加,Pt@Au和Pt@Au@PDA水溶液的温度逐渐升高[图2(B)和(E)].当激光功率为2.0 W/cm²时,Pt@Au和Pt@Au@PDA水溶液的温度分别升至46和56 °C.对浓度为400 μg/mL的纳米粒子用808 nm激光(功率为2.0 W/cm²)进行长时间照射,直至温度达到稳定阶段,然后自然冷却,计算光热转换效率.由图2(C)和(F)可见,Pt@Au和Pt@Au@PDA的光热转换效率分别为33.63%和52.45%,热传递时间分别为322 s[图3(A)]和334 s[图3(C)].最后,固定纳米粒子浓度为400 μg/mL,功率为1.0 W/cm²,分别测试了4个循环的升温-降温曲线.由图3(B)和(D)可见,4个升-降温循环的峰值温度变化很小,说明Pt@Au和Pt@Au@PDA的光热稳定性良好.

2.3 DOX的负载与释放

为了表征DOX的负载量,绘制了DOX溶液的标准曲线[图S4(A)和(B),见本文支持信息],然后将负载DOX后的Pt@Au@PDA-DOX-GOx离心去除,并测定上清液中游离的DOX含量[图4(A)].最终计算出DOX的负载量为44.06%.

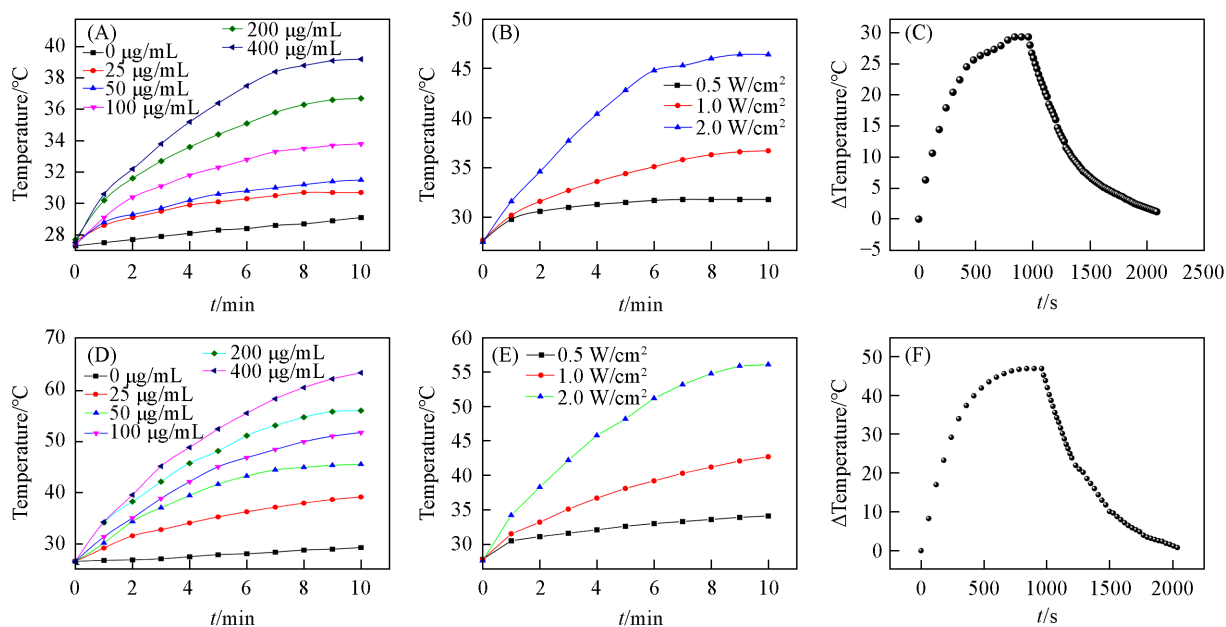


Fig. 2 Pt@Au(A) and Pt@Au@PDA(D) temperature rise curves at different concentrations, heat-up curves of Pt@Au(B) and Pt@Au@PDA(E) at different laser powers, photothermal conversion efficiency of Pt@Au(C) and Pt@Au@PDA(F)

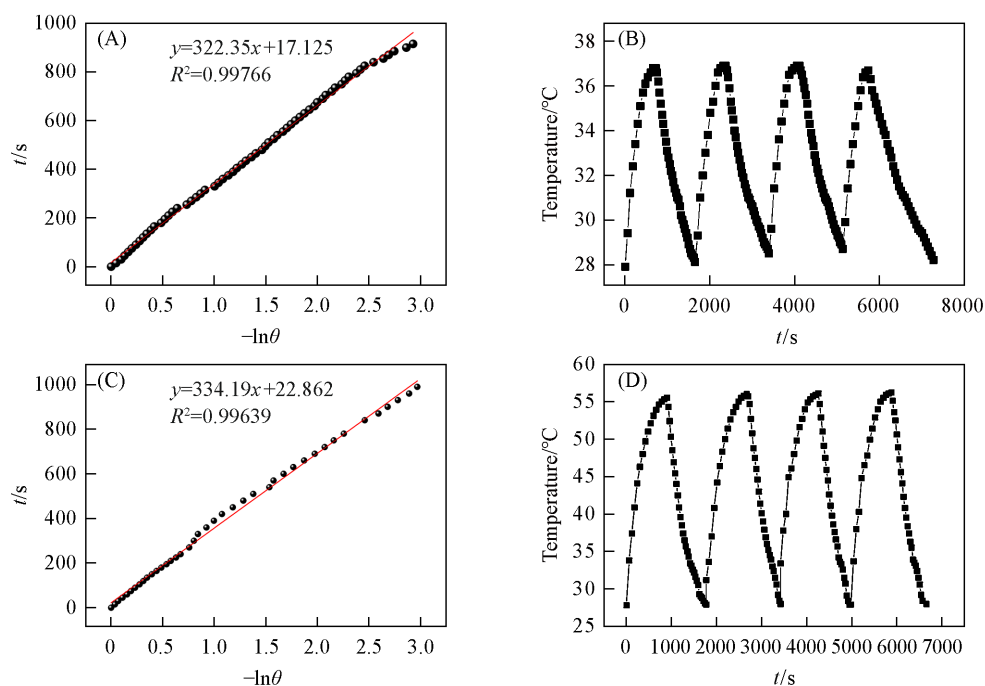


Fig. 3 Heat transfer time for Pt@Au 322 s(A) and Pt@Au@PDA 334 s(C), photothermal stabilities of Pt@Au(B) and Pt@Au@PDA(D)

考察了不同实验条件下 DOX 的释放行为, 绘制了标准曲线[图 S4(C)和(D)]. 利用透析的方法将 Pt@Au@PDA-DOX-GOx 分别置于 pH=5.0, 7.4 及 pH=5.0+NIR(2 W/cm², 10 min) 的 PBS 缓冲溶液中, 每隔 1 h 取点计算 DOX 的释放量. 由图 4(B) 可见, 在 pH=7.4 的条件下只有 21.58% 的 DOX 从纳米粒子中释放出来. 在 pH=5.0 的条件下 DOX 的释放量提高到 40.66%, 说明酸性环境可以促进 PDA 壳层降解, 有利于 DOX 的释放. 在 pH=5.0+NIR 的条件下 DOX 的释放量最高(65.12%), 说明 NIR 照射会升高温度, 加快 PDA 壳层的降解, 进而促进 DOX 的释放.

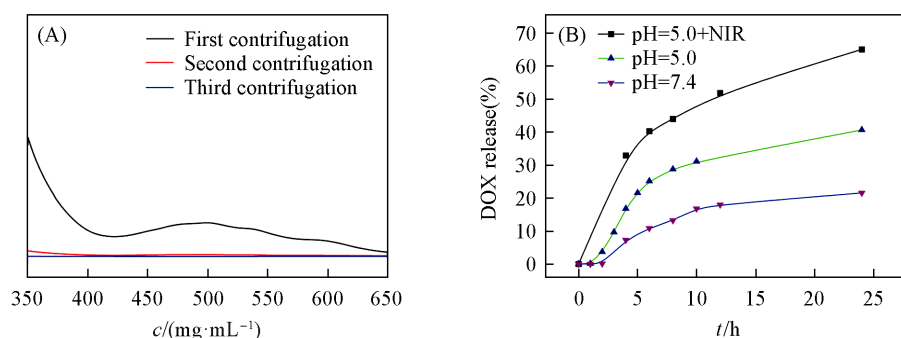


Fig. 4 UV-Vis absorption profiles of the supernatant of DOX-loaded nanoparticles after centrifugations(A), drug release profile of Pt@Au@PDA-DOX-GOx at pH=5.0+NIR, pH=5.0, pH=7.4(B)

2.4 GOx的负载及催化活性

使用蛋白质浓度试剂盒测试Pt@Au@PDA-DOX-GOx中GOx的含量(图S5, 见本文支持信息). 结果表明, GOx的质量分数为12.79%. 修饰在纳米粒子表面的GOx可以与O₂和葡萄糖反应生成葡萄糖酸和H₂O₂, Pt可以催化H₂O₂分解生成O₂, 促进饥饿治疗. 为了验证GOx的催化活性, 分别测试了Pt@Au@PDA-DOX-GOx和Au@PDA-DOX-GOx在含葡萄糖和不含葡萄糖的水溶液中pH值及H₂O₂和O₂含量的变化.

首先, 测试了pH的变化. 由于GOx促进葡萄糖氧化生成葡萄糖酸, 因此, Pt@Au@PDA-DOX-GOx和Au@PDA-DOX-GOx溶液的pH均呈下降趋势[图5(A)]. 随后, 利用H₂O₂试剂盒检测了Pt@Au@PDA-DOX-GOx和Au@PDA-DOX-GOx水溶液在不同葡萄糖浓度条件下的H₂O₂浓度变化, 使用H₂O₂试剂盒绘制了标准曲线[图5(B)]. 由图5(C)可见, 由于Pt可以催化H₂O₂的分解, 使得H₂O₂的浓度略低, 因此, 与Au@PDA-DOX-GOx相比, Pt@Au@PDA-DOX-GOx的H₂O₂含量少.

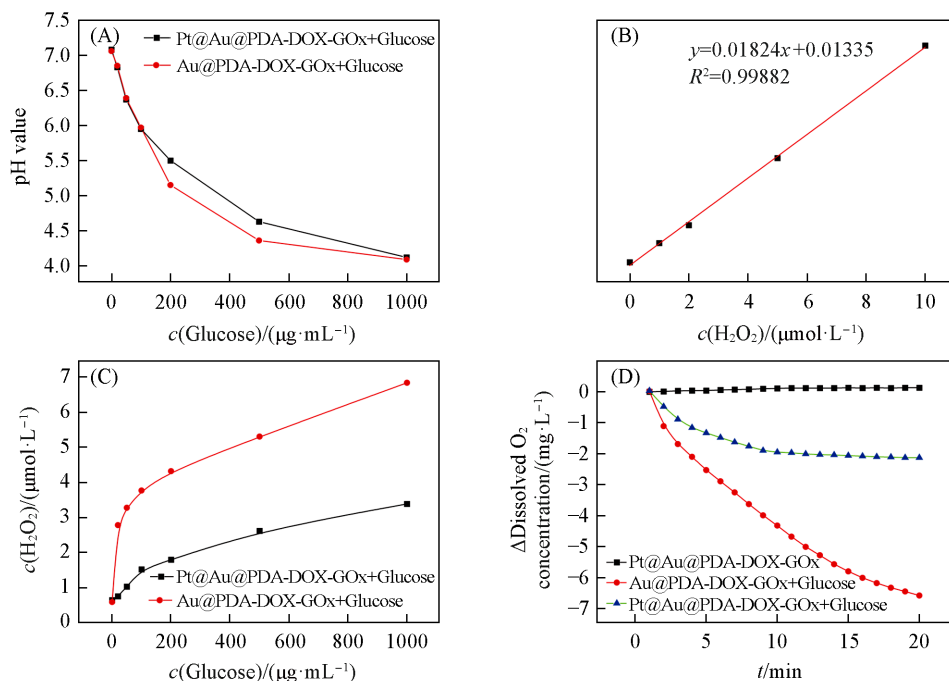


Fig. 5 pH change in solution(A), H₂O₂ standard curve(B), H₂O₂ concentration change in the solution(C), dissolved O₂ changes in solution(D)

最后, 通过溶氧仪测试了Pt@Au@PDA-DOX-GOx和Au@PDA-DOX-GOx溶液中溶解O₂的含量变化. 由图5(D)可见, Pt@Au@PDA-DOX-GOx未加葡萄糖组O₂含量基本无变化. Pt@Au@PDA-DOX-GOx加葡萄糖组由于GOx氧化葡萄糖消耗O₂, Pt又将生成的H₂O₂分解再次生成了O₂, 因此, O₂含量变化先

下降后又逐渐趋于平稳, 变化范围较小. Au@PDA-DOX-GOx组由于GOx逐渐氧化葡萄糖消耗O₂, 因此, O₂含量始终呈下降趋势.

2.5 胶体稳定性和细胞毒性

为了增加肿瘤细胞对纳米粒子的摄取效率, 选用NH₂-PEG_{5K}-cRGD修饰纳米粒子. NH₂-PEG_{5K}-cRGD作为靶向肽, 可以与肿瘤细胞中过表达的 $\alpha v\beta_3$ 特异性结合, 从而实现纳米粒子在肿瘤区域的富集. 将Pt@Au@PDA-cRGD(PAPR), Pt@Au@PDA-DOX-cRGD(PAPDR), Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD(PAPDGR)和Au@PDA-DOX-GOx-cRGD(APDGR)作为研究对象. 为了考察了PAPDGR的胶体稳定性, 首先, 将纳米粒子以100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度分别分散在水、生理盐水、PBS、含10%血清的DMEM培养基及不含血清的DMEM培养基中, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下静置24 h观察其分散情况. 由图S6(见本文支持信息)可见, PAPDGR在水、含10%血清的DMEM培养基、不含血清的DMEM培养基中均无聚沉情况, 生理盐水、PBS出现了少量聚沉现象, 但通过超声后可重新分散.

通过对细胞核进行Hoechst 33342染色, 并利用DOX的红色荧光对纳米粒子进行定位, 考察了人乳腺癌细胞MCF-7细胞对PAPDGR的摄取.

由图6和图7(A)可见, 与未修饰NH₂-PEG-cRGD的纳米粒子相比, 修饰NH₂-PEG-cRGD之后纳米粒子的细胞摄取率更高. 接下来, 选用人皮脂腺细胞SZ-95和人乳腺癌细胞MCF-7分别作为正常细胞和肿瘤细胞, 利用CCK-8方法考察纳米粒子的细胞毒性. 由图7(B)可见, 当纳米粒子浓度在0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内时, 正常细胞和肿瘤细胞的存活率都随粒子浓度的增加而降低, 肿瘤细胞的存活率下降得更快. 这主要是因为GOx的催化活性没有选择性, 在后续

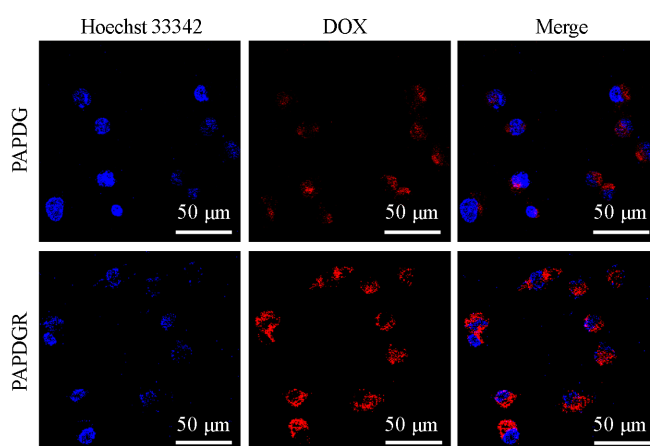


Fig. 6 Cellular uptake images of PAPDG and PAPDGR

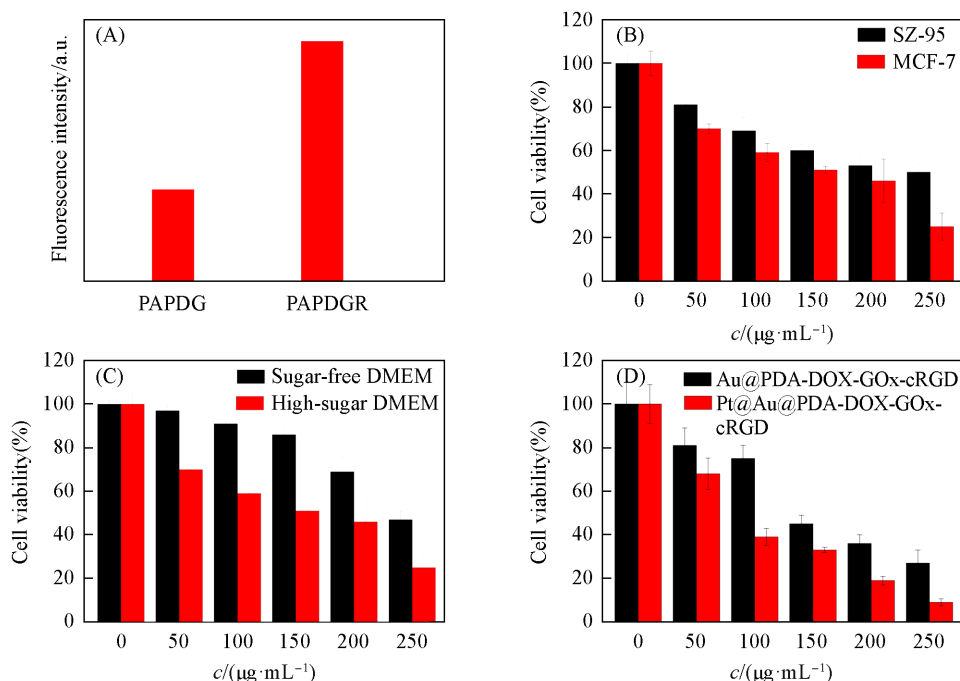


Fig. 7 Comparison of DOX red fluorescence intensity in cells after cellular uptake of different materials(A), cytotoxicity of PAPDGR on normal and tumour cells(B), cytotoxicity of PAPDGR cultured in high sugar/no sugar DMEM(C), cytotoxicity of PAPDGR and APDGR under anaerobic conditions(D)

研究中会尝试对 GO_x 进行响应性包覆,降低其对正常细胞的毒性.当纳米粒子浓度升至 250 μg/mL 时, SZ-95 的细胞活性为 50%,而 MCF-7 的细胞的存活率仅为 25%.这主要可能是因为肿瘤细胞对饥饿治疗的耐受程度更低所致.为了证明这一猜测,分别测试了高糖/无糖 DMEM 培养基中 PAPDGR 对 MCF-7 细胞的细胞毒性[图 7(C)],在高糖培养基中纳米粒子对肿瘤细胞的抑制作用更强.当粒子浓度为 250 μg/mL 时,细胞存活率为 24%.相比之下,在无糖培养基中肿瘤细胞的存活率为 46%,说明 GO_x 诱导的饥饿治疗发挥了作用.

乏氧是实体瘤的主要特征.若想充分发挥饥饿治疗的效果,就需要有效缓解肿瘤乏氧. Pt 作为常见的类过氧化氢酶可以分解 H₂O₂ 生成 O₂,从而缓解肿瘤组织的乏氧微环境.因此,通过厌氧袋营造乏氧环境,测试了 APDGR 和 PAPDGR 在乏氧条件下对 MCF-7 细胞的细胞毒性[图 7(D)],可见,在乏氧条件下 PAPDGR 中 GO_x 消耗细胞内的葡萄糖生成 H₂O₂, Pt 与 H₂O₂ 反应生成 O₂,从而实现自支持饥饿治疗,因此细胞毒性明显高于 APDGR.

2.6 体外抗肿瘤性能

将 MCF-7 细胞分为了 Ctrl, PAPR, PAPR+NIR, PAPDR, PAPDR+NIR, PAPDGR, PAPDGR+NIR 7 组.如图 8(A)所示, NIR 照射会升高温度,降低细胞活性,实现光热治疗;负载 DOX 可以损伤肿瘤细胞的 DNA,促进肿瘤细胞凋亡,实现化疗; NIR 与 DOX 相结合可以显著降低细胞活性,说明升温对 DOX 的释放起到了促进作用;负载 GO_x 可以实现饥饿治疗.当纳米粒子的浓度为 250 μg/mL 时, PAPDGR+NIR 组的细胞存活率仅为 12%,说明化疗+光热治疗+饥饿治疗的联合治疗对 MCF-7 细胞的杀伤作用最强.

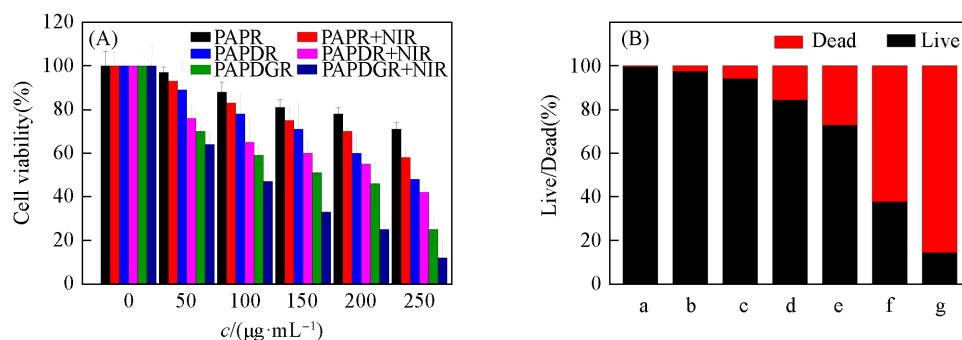


Fig. 8 Summary of cytotoxicity of nanoparticles under different conditions of Ctrl, PAPR, PAPR+NIR, PAPDR, PAPDR+NIR, PAPDGR, PAPDGR+NIR(A), comparison of red and green fluorescence intensity of AM/PI cell staining under different conditions(B)

(B) a—g. Ctrl, PAPR, PAPR+NIR, PAPDR, PAPDR+NIR, PAPDGR, PAPDGR+NIR.

利用 AM/PI 活死细胞染色考察了不同纳米粒子的治疗效果.如图 8(B)与图 9 所示,对照组的细胞均为绿色荧光,即无细胞死亡.实验组因纳米粒子负载的药物和 NIR 激光的照射,可以观察到红色荧光染色的死细胞数量明显增加,尤其是与激光相结合的实验组效果更为显著.联合治疗组中几乎所有细胞都染成了红色,说明对 MCF-7 细胞的杀伤作用最强.

通过流式细胞术进行细胞凋亡及细胞坏死测试.由图 10(A)~(G)可见, PAPR 组中约 17% 的细胞发生凋亡;由于光热治疗作用, PAPR+NIR 组中约 20% 的细胞发生凋亡;由于 DOX 的化疗作用, PAPDR 组中约 23% 的细胞发生凋亡;由于化疗与光热治疗的作用, PAPDR+NIR 组中约 26% 的细胞发生凋亡;由于饥饿治疗与化疗的作用, PAPDGR 组中约 45% 的细胞发生凋亡;由于化疗、光热治疗及饥饿治疗的联合作用, PAPDGR+NIR 组中约 52% 的细胞发生凋亡.结果进一步证明了联合治疗的效果最为显著.

DOX 可以通过上调 Bax 及 Cyt-c 的表达、下调 Bcl-2 的表达诱导细胞凋亡.为了验证这一过程,对负载 DOX 的纳米粒子进行 ELISA 测试,各项指标的标准曲线如图 S7(见本文支持信息)所示.实验分组如下: Ctrl, PAPR, PAPDR, PAPDR+NIR, PAPDGR 和 PAPDGR+NIR.由图 11 可见,负载 DOX 后 Bax 和

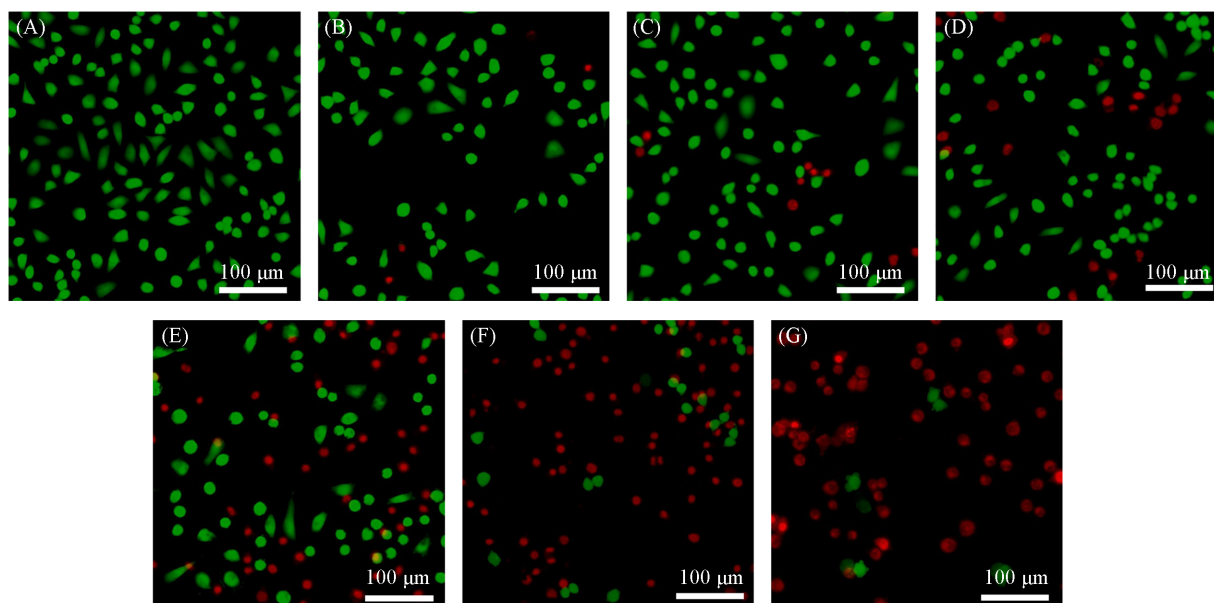


Fig. 9 AM/PI cell staining under different conditions of Ctrl(A), PAPR(B), PAPR+NIR(C), PAPDR(D), PAPDR+NIR(E), PAPDGR(F) and PAPDGR+NIR(G)

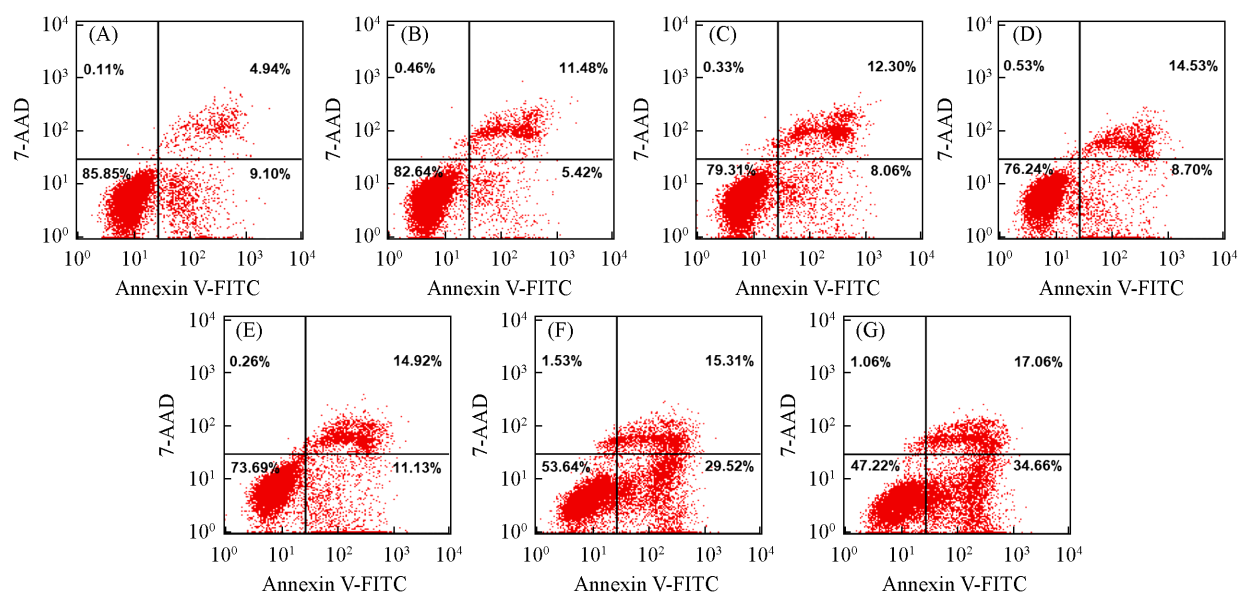


Fig. 10 Flow cytometry tests for apoptosis and necrosis in Ctrl(A), PAPR(B), PAPR+NIR(C), PAPDR(D), PAPDR+NIR(E), PAPDGR(F) and PAPDGR+NIR(G) under different conditions

Cyt-c 的表达逐渐增加, NIR 照射促进了 DOX 的释放和 Bax, Cyt-c 的上调, 并抑制了 Bcl-2 的表达. 同时, 用 ELISA 试剂盒测试了细胞内缺氧因子 HIF-1 α 的表达, 细胞乏氧越严重, 缺氧因子的表达越高, 可以观察到 Pt@Au 与 Au 均会促进 HIF-1 α 上调.

为了证明 GO_x 诱导的饥饿治疗, 表征了细胞内 pH, O₂ 以及 H₂O₂ 的含量变化. 首先, 使用 BCECF-AM 来检测细胞内的 pH. 实验分组如下: Ctrl, PAPR, PAPR+NIR, PAPDR, PAPDR+NIR, PAPDGR, PAPDGR+NIR 和 APDGR. 由图 12 可见, 对照组与未修饰 GO_x 的实验组中细胞的绿色荧光强度较强. 修饰 GO_x 之后, 由于 GO_x 氧化葡萄糖生成了葡萄糖酸导致细胞内的 pH 下降, 绿色荧光明显减弱, 说明 pH 的下降是由 GO_x 诱导的饥饿治疗造成的[图 13(A)].

随后, 以 ROS-ID 作为检验 O₂ 含量的探针, 来验证细胞内的 O₂ 含量. 将 MCF-7 细胞分别在常氧/乏氧的条件下培养, 测试细胞内 O₂ 含量, 实验分组如下: Ctrl, PAPDGR 和 APDGR. 由图 14 与图 13(B) 可

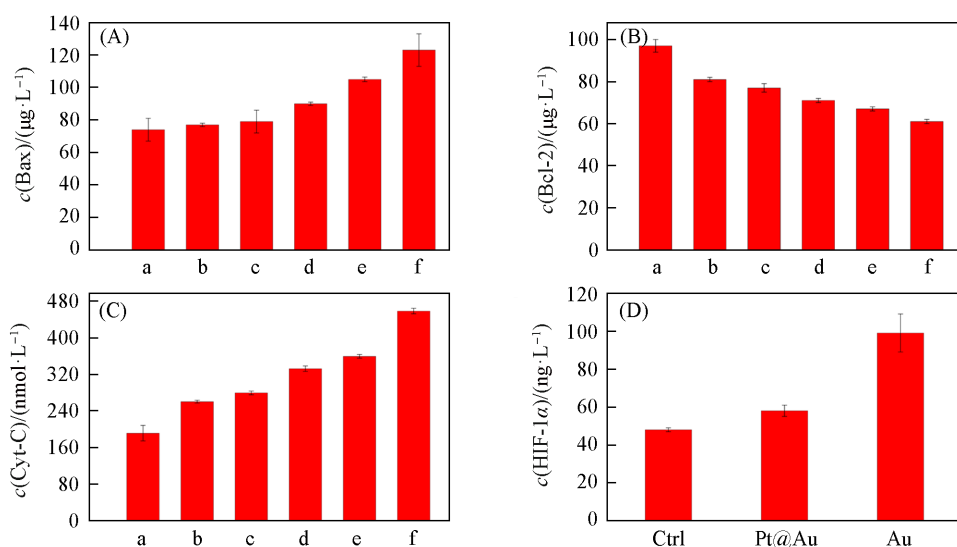


Fig. 11 Bax(A), Bcl-2(B), Cyt-C(C) proteins and HIF-1 α hypoxia factor(D) content after different treatments (A—C) a—f. Ctrl, PAPR, PAPDR, PAPDR+NIR, PAPDGR, PAPDGR+NIR.

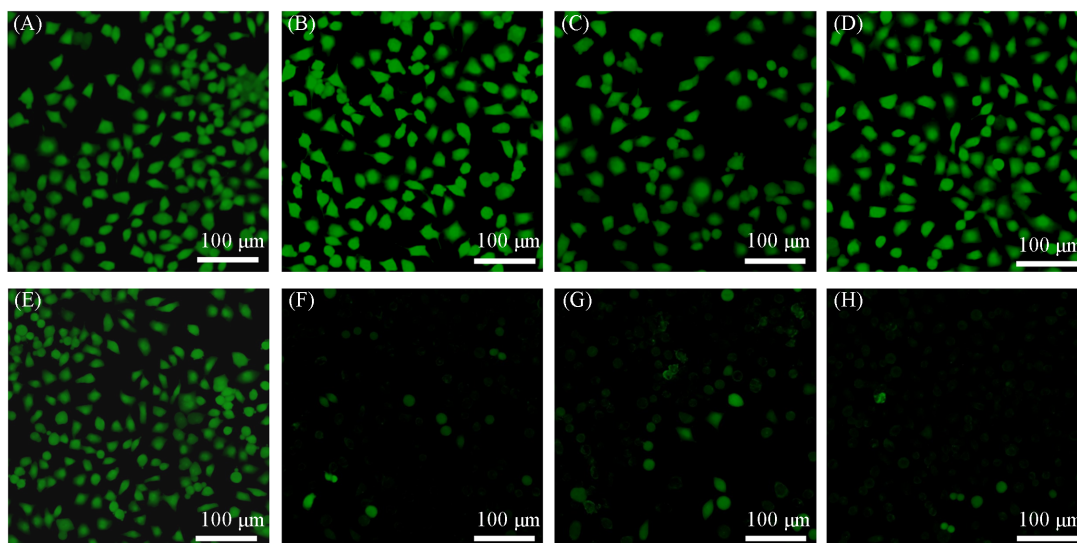


Fig. 12 Changes in intracellular pH in the fluorescence field of view of different experimental subgroups (A) Ctrl; (B) PAPR; (C) PAPR+NIR; (D) PAPDR; (E) PAPDR+NIR; (F) PAPDGR; (G) PAPDGR+NIR; (H) APDGR.

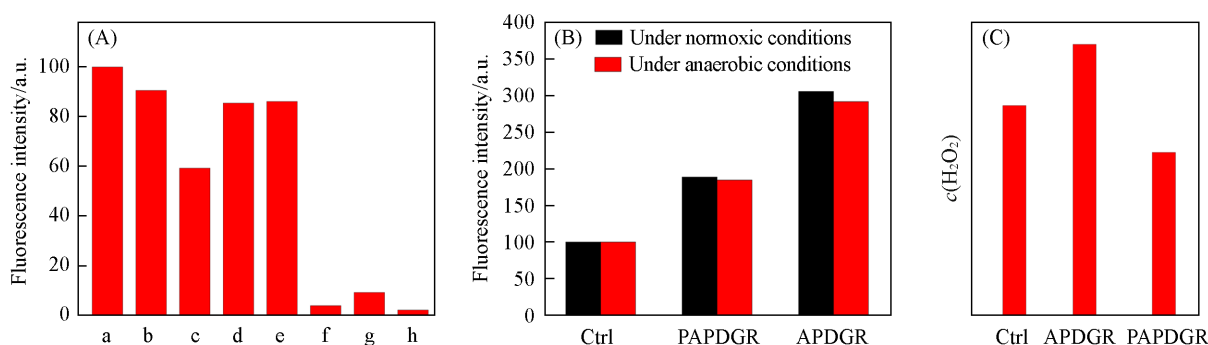


Fig. 13 Fluorescence intensity of intracellular pH changes in the fluorescence field of view of different experimental subgroups(A), fluorescence intensity showing the oxygen content of Ctrl, PAPDGR and APDGR under normoxic and anaerobic conditions(B) and intracellular H₂O₂ content in the Ctrl, PAPDGR and APDGR groups(C) (A) a. Ctrl, b. PAPR, c. PAPR+NIR, d. PAPDR, e. PAPDR+NIR, f. PAPDGR, g. PAPDGR+NIR, h. APDGR.

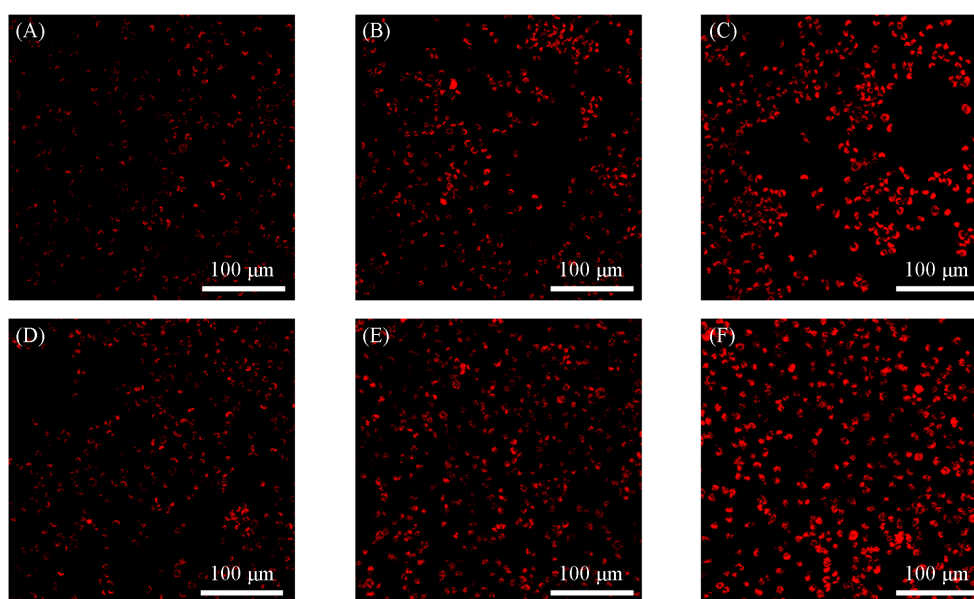


Fig. 14 O_2 content of Ctrl(A, D), PPDGR(B, E) and APDGR(C, F) groups under normoxia(A—C) and anaerobic conditions(D—F)

见,无论在常氧还是乏氧条件下,APDGR组 O_2 含量均是最低的,红色荧光最强.这主要是由于GOx诱导的饥饿治疗不断消耗 O_2 .PPDGR组由于Pt的产氧能力,在GOx消耗 O_2 后,Pt又与 H_2O_2 反应生成了 O_2 .因此,PPDGR组的乏氧程度明显低于APDGR组.而乏氧组整体的 O_2 含量均低于常氧组.由于Pt的产氧能力,PPDGR组缺氧因子的表达明显低于APDGR组.ELISA的测试结果与细胞内 O_2 含量的结果相符[图11(D)],说明了Pt具有优异的产 O_2 性能,可以缓解细胞内乏氧.

最后,通过 H_2O_2 检测试剂盒来检测细胞内的 H_2O_2 含量(图S8,见本文支持信息).将MCF-7细胞按如下分组进行实验:Ctrl,PPDGR和APDGR.由图13(C)可见,APDGR组中GOx可以氧化葡萄糖产生 H_2O_2 ,因此, H_2O_2 的含量高.PPDGR组中Pt可以促进 H_2O_2 分解,因此, H_2O_2 含量低.

2.7 体内分布

将MCF-7细胞注射到Balb/c雌性裸鼠皮下构建小鼠肿瘤动物模型.接种14 d后肿瘤体积平均达到约 100 mm^3 ,然后以尾静脉的方式给药,给药剂量为250 mg.接下来,分别在12, 24, 36和48 h处死小鼠,将解剖的组织称重并用王水处理,利用ICP-OES测定Au元素含量,评价纳米粒子在小鼠肿瘤和主要器官(心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏)中的生物分布.由图15可见,在给药36 h后Au元素在肿瘤区域达到了最大富集.纳米粒子的体内分布主要集中在肝脏和脾脏中,在其它器官的含量微乎其微.在后续工作中,可筛选端基带电性质不同的聚乙烯醇(PEG)对纳米粒子进行修饰,降低其在主要器官的富集.

2.8 体内抗肿瘤性能

将Balb/c雌性裸鼠(约18 g)随机分为4组(平行实验组数 $n=3$):Ctrl,PPDR,PAPDR和PPDGR.在小鼠尾静脉给药36 h后,对4组小鼠的肿瘤区域进行NIR照射(2 W/cm^2 , 10 min),并用红外相机记录肿瘤区域的温度变化.如图16所示,PPDR,PAPDR和PPDGR组的肿瘤区域温度均高于对照组,说明纳米粒子具有优异的光热转化性能,可以对小鼠肿瘤进行光热治疗.

由图17可见,在16 d的治疗过程中,7组小鼠体重均没有明显的变化,说明纳米粒子没有明显的

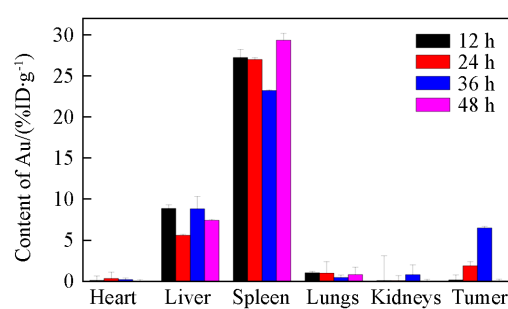


Fig. 15 Elemental Au distribution of PPDGR in major organs and tumor sites at different time points

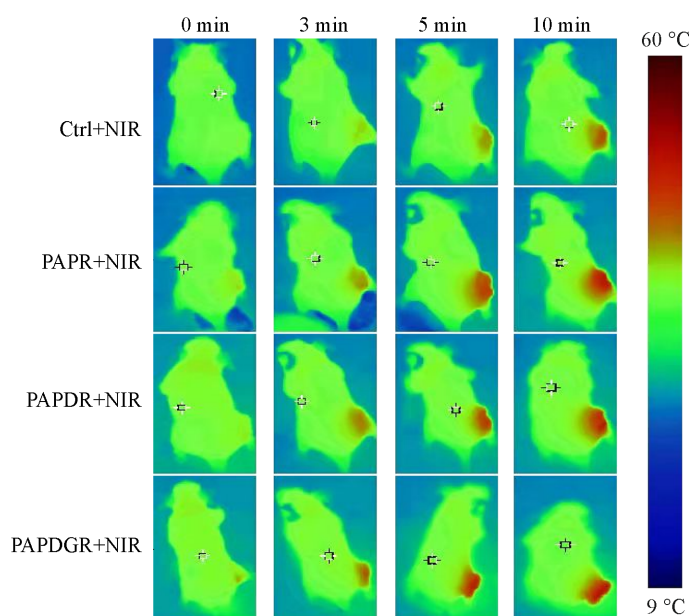


Fig. 16 Infrared thermograms of tumor regions of Balb/c mice at different time points in Ctrl+NIR, PAPR+NIR, PAPDR+NIR, PAPDGR+NIR groups

毒副作用[图 17(A)]. 而 7 组小鼠的肿瘤生长情况表现出不同的结果[图 17(B)]. Ctrl 和 PAPR 组肿瘤生长没有任何的抑制; 在 PAPR+NIR 组中, 光热治疗可以轻微抑制肿瘤的生长, 但效果并不明显; 由于 DOX 可以诱导肿瘤细胞凋亡从而抑制肿瘤生长, PAPDR 组肿瘤的生长受到了显著的抑制; 由于化疗与光热治疗、化疗与饥饿治疗之间的联合, PAPDR+NIR 和 PAPDGR 组肿瘤的生长受到进一步抑制. 而对肿瘤生长最显著的抑制作用出现在 PAPDGR+NIR 组, 说明联合治疗对肿瘤的生长起到了明显的抑制作用且治疗效果最显著. 在治疗结束后将小鼠肿瘤切除、拍照并称重, 进一步证明了联合治疗效果显著.

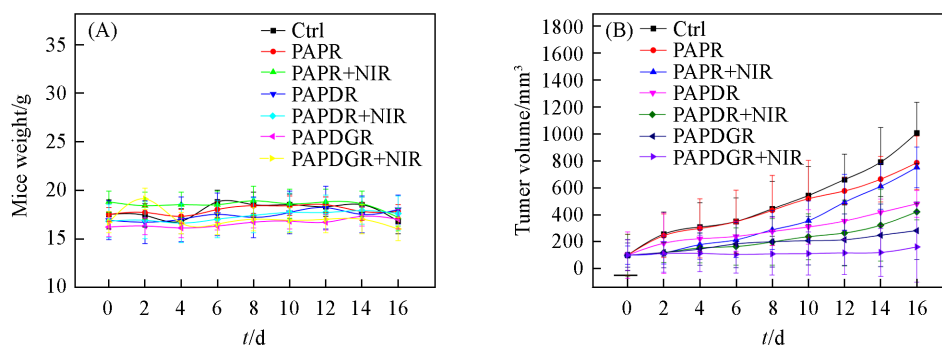


Fig. 17 Body weight changes(A) and tumor volume changes(B) in mice within 16 d

为了验证纳米粒子对肿瘤的杀伤作用, 对小鼠的肿瘤组织进行了 H&E 切片染色. 由图 18(A)~(G) 可见, 与对照组相比, 实验组中肿瘤组织所出现的核固缩(深蓝色细胞核)以及组织坏死(浅粉色区域)程度是逐渐增加的, 说明联合治疗对肿瘤的治疗效果最显著.

为了验证 Pt 在体内治疗中的产 O_2 性能, 对肿瘤切片进行了 HIF-1 α 染色. 蓝色区域为细胞核, 绿色区域为 HIF-1 α 表达. 绿色荧光区域越大, 表示组织缺氧越严重. 由图 19 与图 S9(A) (见本文支持信息) 可见, 对照组和未修饰 GOx 组 HIF-1 α 的表达均低于修饰 GOx 组, 主要是因为 GOx 可以消耗 O_2 . 但由于 Pt 具有产 O_2 的性能, 因此 Pt 的存在可以缓解缺氧.

为了验证肿瘤细胞的凋亡情况, 进行了 TUNEL 染色. 由图 20 与图 S9(B) 可见, 对照组的肿瘤细胞无细胞凋亡现象. 与对照组相比, 实验组绿色荧光区域逐渐增加, 说明细胞凋亡程度逐渐增加, 也进一步证明了联合治疗组的疗效最好.

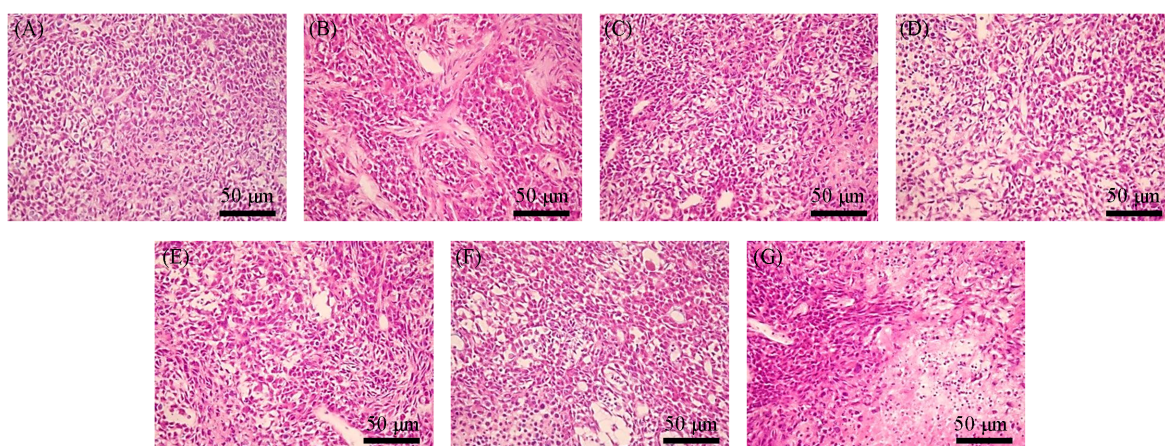


Fig. 18 H&E staining of mouse tumours of Ctrl(A), PAPR(B), PAPR+NIR(C), PAPDR(D), PAPDR+NIR(E), PPDGR(F) and PPDGR+NIR(G)

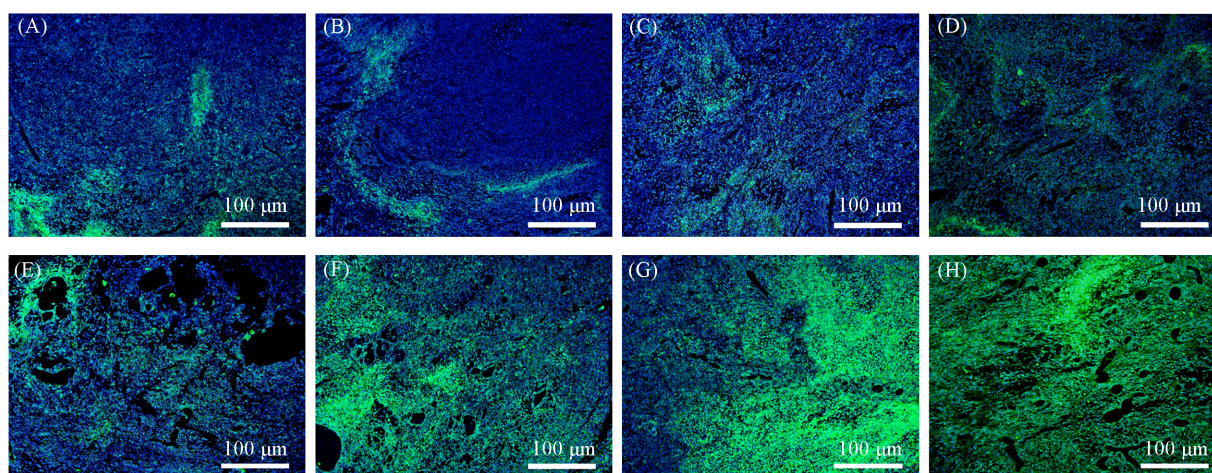


Fig. 19 Expression of the mouse tumor hypoxia factor HIF-1 α of Ctrl(A), PAPR(B), PAPR+NIR(C), PAPDR(D), PAPDR+NIR(E), PPDGR(F), PPDGR+NIR(G) and APDGR(H)

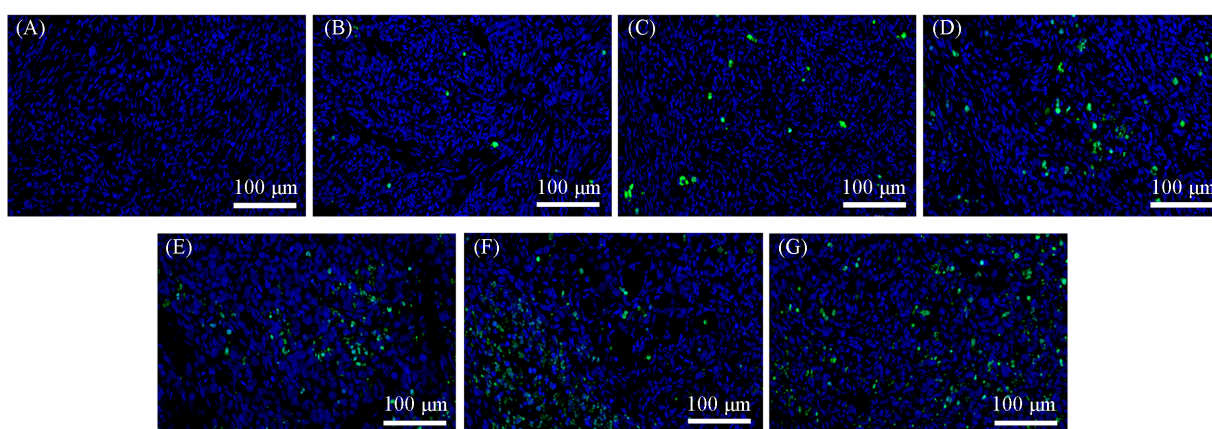


Fig. 20 TUNEL section staining of mouse tumours of Ctrl(A), PAPR(B), PAPR+NIR(C), PAPDR(D), PAPDR+NIR(E), PPDGR(F) and PPDGR+NIR(G)

2.9 生物安全性

为了进一步评估纳米粒子的生物安全性, 在第 16 d 治疗结束后, 收集了各组小鼠的主要器官(心、肝、脾、肺、肾)进行 H&E 染色(图 S10, 见本文支持信息). 结果表明, 所有组小鼠的心、脾、肺均正

常. 个别组的肝、肾切片可见一定的空泡, 但并未发现组织缔结以及组织增生现象, 可能是由于小鼠比较肥胖, 出现了脂化现象. 最后, 收集了小鼠的血液进行肝肾功能的生化分析, 所有组的各项指标相差很小且在正常范围内. 以上结果说明纳米粒子的生物安全性良好.

3 结 论

构筑了Pt@Au@PDA-DOX-GOx-cRGD作为新型纳米治疗平台, 实现了针对肿瘤的联合治疗. 通过将化疗-光热治疗-自促进饥饿治疗3种治疗功效整合到同一纳米结构中, 有效克服了单一治疗方式治疗效果不理想的缺点. 通过光热治疗在热消融肿瘤组织的同时加速化疗药物的释放, 提高了化疗的治疗效果; 利用类过氧化氢酶的催化活性改善肿瘤组织的乏氧特性, 促进饥饿治疗的治疗效果. 因此, 设计的纳米治疗平台为未来肿瘤的协同治疗提供了新的思路. 与此同时, 纳米治疗平台仍然存在对正常细胞毒性较高、肝脾富集严重的问题. 后续研究会进一步优化纳米治疗平台的表面修饰策略, 在降低其毒副作用的同时, 提高其肿瘤治疗的性能.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20240467>.

参 考 文 献

- [1] Radosław M., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10(9), 7541—7561
- [2] Zhao W. G., Hu J., Gao W. P., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9(28), 23528—23535
- [3] Ma H. S., Yu Q. Q., Qu Y., Zhu Y. F., Wu C. T., *Bioactive Mater.*, **2021**, 6, 4558—4567
- [4] Bao Y. H., Chen J. F., Qiu H. Q., Zhang C., Huang P. T., Mao Z. W., Tong W. J., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, 13(21), 24532—24542
- [5] Wang H., Li J., Wang Y. Q., Gong X., Xu X. X., Wang J. Y., Li Y. P., Sha X. Y., Zhang Z. W., *J. Controlled Release*, **2020**, 319, 25—45
- [6] Li W. T., Liu S. K., Dong S. M., Gai S. L., Zhang F. M., Dong Y. S., Yang D., He F., Zhong L., Yang P. P., *Chem. Engin. J.*, **2021**, 405, 127027
- [7] Kumari R., Sunil D., Ningthoujam R. S., *J. Controlled Release*, **2020**, 319, 135—156
- [8] Hu H. M., Yan X. F., Wang H., Tannka J., Wang M. Z., You W., Li Z. B., *J. Mater. Chem. B*, **2019**, 7, 1116—1123
- [9] Hu C. L., Wang J. Z., Liu S. N., Cai L. H., Zhou Y., Liu X. J., Wang M., Liu Z. D., Pang M. L., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, 13(4), 4825—4834
- [10] Yang C. L., Liu Y. Z., Su S., Gao N., Jing J., Zhang X. L., *J. Mater. Chem. B*, **2020**, 8, 9943—9950
- [11] Zhang Y., Lin L., Liu L., Liu F., Sheng S., Tian H. Y., Chen X. S., *Biomaterials*, **2019**, 216, 119255
- [12] Kou Y. K., Dai Z. C., Cui P., Hu F. Z., Tian L., Zhang F. F., Duan H. Q., Xia Q. Y., Liu Q. Y., Zheng X. W., *J. Mater. Chem. B*, **2021**, 9, 8480—8490
- [13] Huo T. T., Chen L. L., Nie H. F., Li W. H., Lin C. T., Akhtar M., Huang R. Q., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2022**, 14(3), 3675—3684
- [14] Cheng K. W., Ling C. X., Gu D. H., Gao Z. G., Li Y. J., An P. J., Zhang Y., You C. Q., Zhang R., Sun B. W., *New J. Chem.*, **2020**, 44, 1524—1536
- [15] Du X., Zhang T., Ma G., Gu X., Wang G., Li J., *Int. J. Nanomed.*, **2019**, 14, 2233—2251
- [16] Gao G., Jiang Y. W., Guo Y. X., Jia R. H., Cheng X. T., Deng Y., Yu X. W., Zhu Y. X., Guo H. Y., Sun W., Liu X. Y., Zhao J., Yang S. H., Yu Z. W., Raya F. M. S., Liang G. L., Wu F. G., *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, 30, 1909391
- [17] Chen W. H., Yu K. J., Hou J. W., Pang H. H., Weng W. H., Lin W. S., Yang H. W., *ACS Appl. Bio Mater.*, **2021**, 4(10), 7485—7496
- [18] Ren J. J., Zhang L., Zhang Y. J., Zhang W., Cao Y., Xu Z. G., Cui H. J., Kang Y. J., Xue P., *Biomaterials*, **2020**, 234, 119771
- [19] Zou Y., Liu W. J., Sun W., Du J. J., Fan J. L., Peng X. J., *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 2111853
- [20] Yang J. Z., Ding J. X., *Chinese J. Appl. Chem.*, **2022**, 39(5), 855—856
- [21] Liu Y., Zhuang Y. L., Ding J. X., *J. Funct. Poly.*, **2023**, 36(1), 1—5
- [22] Lv H., Xu D., Henzie J., Feng J., Lopes A., Yamauchi Y., Liu B., *Chem. Sci.*, **2019**, 10, 6423

(Ed.: Y, K, S)