

基于上转换纳米粒子多糖探针的构建及其在肿瘤成像中的应用

巩洁^{1*}, 于淼^{2*}, 李秀勇³, 陈颖¹, 徐倩茹¹, 李梅娟¹, 李艺彤¹, 刘秀美¹

(1.山东大学齐鲁医学院药学院, 山东 济南 250012; 2.菏泽医学专科学校药学与检验系, 山东 菏泽 274000; 3.烟台海关技术中心, 山东 烟台 264000)

摘要: **目的** 构建一种用上转换纳米颗粒(upconversion nanoparticles, UCNPs)与硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)连接的探针, 开发肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)早期诊断的方法。 **方法** 以己二酸二酰肼(adipic acid hydrazide, ADH)为桥梁, 构建 UCNPs-CS 探针。首先, CS 在 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC]和 N-羧基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)的催化下合成 CS-ADH, CS 具有肿瘤靶向性, 可作为探针的靶向基团。然后, 由溶剂热法制备 NaYF₄:Yb,Tm@NaYF₄ 核壳结构的 UCNPs, 制备的 UCNPs 的荧光发射带在 800 nm 左右, 可作为荧光报告基团用于体内成像。UCNPs 通过聚丙烯酸(polyacrylic acid, PAA)衍生转水后由羧基氨基偶联反应制备 UCNPs-CS 纳米荧光探针。UCNPs 经光谱、核磁、透射电镜等对形貌和光学性质进行表征, 并通过 MTT 实验对探针的细胞毒性进行考察。通过构建肝癌小鼠模型, 评价探针体内成像和肿瘤靶向能力, 并利用体内成像评估不同抗肿瘤药物的活性。 **结果** 制备的核壳结构 UCNPs 形貌均匀, 大小均一, 尺寸约 35 nm, 壳层厚度约 3~4 nm, 在水中分散性好。构建的 UCNPs-CS 探针具有良好的发光性能(激发波长 980 nm, 荧光发射波长 800 nm)和细胞相容性(在质量浓度高达 500 μg/mL 时, 24 h 后的细胞存活率大于 60%), 具有较强的组织穿透力, 可实现动物水平的活体成像。肝癌小鼠体内成像结果表明, 构建的 UCNPs-CS 探针具有较好的肿瘤靶向性, 且成像光辐射强度与肿瘤体积呈正相关。 **结论** 构建的 UCNPs-CS 探针为 HCC 早期可视化诊断提供一种新工具, 同时也为抗肿瘤药物的活性筛选提供一种新思路。

关键词: 硫酸软骨素; 上转换纳米颗粒; 肝细胞癌; 生物成像; 药物活性筛选

中图分类号: R917 **文献标志码:** A

Construction of polysaccharide probe based on upconversion nanoparticles and its application in tumor bioimaging

GONG Jie^{1*}, YU Miao^{2*}, LI Xiuyong³, CHEN Ying¹, XU Qianru¹, LI Meijuan¹, LI Yitong¹, LIU Xiumei¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China;

2. Department of Pharmacy and Medical Laboratory Science, Heze Medical College, Heze 274000, Shandong, China;

3. Technology Center, Yantai Customs, Yantai 264000, Shandong, China)

Abstract: Objective To develop a probe for early diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) by connecting upconversion nanoparticles (UCNPs) with chondroitin sulfate (CS). **Methods** The UCNPs-CS nanoprobe was constructed using adipic acid hydrazide (ADH) as a bridging agent. First, CS, which exhibits tumor-targeting properties and serves as the targeting moiety of the probe, was functionalized to synthesize CS-ADH under the catalysis of 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS). Subsequently, NaYF₄:Yb,Tm@NaYF₄ UCNPs with a core-shell structure were prepared via a solvothermal method. The synthesized UCNPs exhibited fluorescence emission bands around 800 nm, making them suitable as fluorescent reporters for *in vivo* imaging.

收稿日期: 2024-04-26

基金项目: 国家重点研发计划(2020YF1313902); 山东省自然科学基金(ZR2022MH238)

通信作者: 刘秀美. E-mail: liuxium@sdu.edu.cn

* 共同第一作者

The UCNPs were rendered water-dispersible through polyacrylic acid (PAA) surface modification and then conjugated with CS-ADH via carboxyl-amine coupling to form the UCNPs-CS nanoprobe. The morphology, optical properties, and chemical composition of the UCNPs were characterized using spectroscopy, nuclear magnetic resonance (NMR), transmission electron microscopy (TEM), and other analytical techniques. The cytotoxicity of the probe was evaluated via MTT assay. To assess the probe's *in vivo* imaging performance and tumor-targeting efficacy, hepatoma-bearing mouse models were established. Furthermore, the activity of different antitumor drugs was evaluated using *in vivo* imaging. **Results** The prepared UCNPs with core-shell structures had uniform morphology and size, with a size of about 35 nm and a shell thickness of about 3-4 nm. They had good dispersibility in water. The constructed UCNPs-CS probe had good luminescence performance (excitation wavelength 980 nm, fluorescence emission wavelength 800 nm), cell compatibility (cell survival rate greater than 60% after 24 hours at a concentration of up to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), strong tissue penetration ability, and could achieve *in vivo* imaging at the animal level. The imaging results of liver cancer mice showed that the constructed UCNPs-CS probe had good tumor targeting ability, and the imaging radiation intensity was positively correlated with tumor volume. **Conclusion** The UCNPs-CS probe provides a new tool for early visual diagnosis of HCC, and also provides a new idea for the activity screening of anti-tumor drugs.

Key words: Chondroitin sulfate; Upconversion nanoparticles; Hepatocellular carcinoma; *In vivo* imaging; Drug activity screening

肝癌是全球因癌症死亡的常见原因。肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的肝癌类型,具有高转移率和高死亡率的特点^[1]。由于 HCC 早期症状不明显,许多患者就诊时已发展至中晚期,错过了最佳治疗时间,很难治愈。因此,开发 HCC 的早期诊断方法,对于提高 HCC 的早期诊断率及临床疗效具有重要意义。

肿瘤可视化是一项前沿技术,在生物成像技术的基础上,研究细胞乃至个体水平上的生物过程,利用特定的分子探针对靶标进行跟踪和成像,可直观地观察到肿瘤的生长、转移以及分布,具有较高的灵敏度。该方法操作简单,在肿瘤诊断、跟踪肿瘤发展和肿瘤治疗方面具有较大的应用前景^[2-6]。

基于此,本研究拟构建一种基于核壳结构的上转换纳米颗粒 (upconversion nanoparticles, UCNPs) 和硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 功能化的靶向纳米荧光探针,用于肿瘤活体成像,为肝癌早期诊断提供一种新策略,同时也为抗肿瘤药物的活性筛选和评价提供新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

CS(纯度>99.0%)购自烟台东城生物化工有限公司, $\text{Y}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (纯度>99.99%)、 $\text{Yb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (纯度>99.99%)、 $\text{Tm}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (纯度>99.9%)购自济宁天一新材料有限公司,己二酸二酰肼 (adipic acid hydrazide, ADH, 纯度>99.0%)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐

[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC, 纯度>98.0%]、N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimid, NHS, 纯度>98.0%)、1-十八烯 (1-octadecene, ODE, 纯度>90.0%)、聚丙烯酸 (polyacrylic acid, PAA, $M_w = 3\ 000$, 50%水溶液)、邻苯二甲醛(纯度>98.0%)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,油酸 (oleic acid, OA)、NaOH (纯度>96.0%)、 NH_4F (纯度>96.0%)、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS, 纯度>97.0%)、环己烷、乙醇均购自国药集团化学试剂有限公司,十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB, 纯度>99.0%)购自天津市大茂化学试剂厂, $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (纯度25%~28%)购自天津广福精细化工有限公司,甲醇购自天津市富宇化工有限公司, HCl(纯度36%~38%)购自莱阳市康德化工有限公司, 硼砂(纯度>99.5%)购自天津广诚化工有限公司, β -巯基乙醇(纯度>99.0%)购自麦克林试剂有限公司,去离子水取自美国 Milli-Q 纯水系统。RPMI 1640和胰蛋白酶-EDTA购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,胎牛血清购自浙江天航生物科技有限公司,青霉素-链霉素液体和 MTT 细胞增殖和细胞毒性测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,顺铂、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 购自美国 Sigma 公司。

1.1.2 主要仪器

HT7700 型透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 购自日立高新技术公司 (HITACHI), Smart Lab 3 kw 高分辨 X 射线衍射仪 (X-ray diffractometer, XRD) 购自日本理学电机株式会社, Thermo Scientific Nicolet iN10 型傅里叶变

换显微红外光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)购自美国赛默飞世尔科技公司, Bruker AV600核磁共振波谱仪(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)购自德国布鲁克科技公司, FluoroMax-4高灵敏度集成荧光光谱仪(980 nm 激发)购自日本Horiba公司, PerkinElmer IVIS Spectrum活体成像系统购自美国珀金埃尔默股份有限公司。

1.1.3 实验动物

雌性KM小鼠40只,体质量22~26 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。本研究经山东大学齐鲁医学院动物伦理审查委员会批准(SYXK鲁:20190005)。

1.2 方法

1.2.1 探针的构建

1.2.1.1 NaYF₄: 20% Yb, 1% Tm的合成

利用溶剂热法^[7]制备NaYF₄: 20% Yb, 1% Tm(简称为NaYF₄: Yb, Tm)。称取Y(CH₃CO₂)₃·4H₂O(3.16 mmol)、Yb(CH₃CO₂)₃·4H₂O(0.8 mmol)、Tm(CH₃CO₂)₃·4H₂O(0.04 mmol)于500 mL三口烧瓶中,加入40 mL OA和60 mL ODE,通N₂ 20 min后,搅拌加热至160℃,保持30 min使固体完全溶解并混合均匀,自然冷却至室温,加入含有10 mmol NaOH和16 mmol NH₄F的40 mL甲醇溶液,在N₂保护下升温至50℃反应40 min,继续升温至110℃除去体系中所有的甲醇,将溶液升温至295℃反应90 min,反应结束后,冷却至室温,加入无水乙醇离心沉淀数次后,挥发溶剂,得到固体NaYF₄: Yb, Tm。

1.2.1.2 NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄的合成

取2 mmol Y(CH₃CO₂)₃·4H₂O于250 mL三口烧瓶中,加入12 mL OA和30 mL ODE,通入N₂ 20 min,搅拌加热至160℃,保持30 min使固体完全溶解并混合均匀,自然冷却至80℃,向溶液中加入分散在12 mL环己烷中的3 mmol NaYF₄: Yb, Tm,搅拌30 min,自然降温至50℃,加入10 mL含有5 mmol NaOH和8 mmol NH₄F的甲醇溶液,在N₂中保护反应40 min,逐渐升温至110℃,升温至300℃反应90 min,反应结束后,冷却至室温,加入无水乙醇离心沉淀数次后,挥发溶剂得到核壳结构的固体NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄。

1.2.1.3 NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄@PAA的合成

取80 mg 1.2.1.2制备的固体分散于2 mL环己烷中,加入20 mL含0.1 g CTAB的蒸馏水,剧烈搅拌使环己烷挥发形成CTAB封端材料,加入45 μL 2 mol/L NH₃·H₂O,30 μL 0.2 g/mL PAA水溶液,超声分散30 min后,在不断搅拌下逐滴加入

40 mL异丙醇,用蒸馏水洗涤数次后冷冻干燥得到NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄@PAA固体。

1.2.1.4 CS-UCNPs-Tm的合成

首先合成CS-ADH。准确称取100 mg CS溶于适量水中,加入400 mg EDC和58.5 mg NHS,用HCl调节pH至6~7,37℃水浴活化羧基15 min,加入880 mg ADH调节pH至6~7,37℃水浴反应24 h,水透析3 d(截断分子量=4 000 Da),冷冻干燥得到固体CS-ADH。

合成CS-UCNPs-Tm。称取100 mg NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄@PAA,加入适量水并超声分散45 min,称取80 mg EDC和11.7 mg NHS,溶于少量水,加入分散好的NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄@PAA水溶液,边搅拌边加入,37℃、15 min后,精密称取100.0 mg CS-ADH,37℃,搅拌24 h,反应结束后,5 000 r/min离心10 min,取上清液,水透析3 d(截留分子量=4 000 Da),冷冻干燥得到CS-NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄@PAA(简称为CS-UCNPs-Tm)固体。

1.2.2 细胞毒性试验

通过MTT实验考察5~500 μg/mL质量浓度范围内CS-UCNPs-Tm探针对于Bel-7402细胞的毒性。96孔板设置调零孔、对照孔和5、10、25、50、100、250和500 μg/mL样品孔。取对数生长期的人源肝癌细胞Bel-7402,经胰蛋白酶消化后,加入两倍体积的细胞完全培养基终止消化,800 r/min离心5 min,用细胞完全培养基重悬稀释后,以8 000个细胞/孔接种于除调零孔外的96孔板中,将接种好的96孔板置于37℃、5% CO₂恒温培养箱中培养至细胞贴壁。然后分别向调零孔和对照孔中加入100 μL完全细胞培养液,样品孔依次加入相应质量浓度的CS-UCNPs-Tm探针分散液。在恒温培养箱中孵育12、24 h后,取出并弃去每孔中的溶液,用无菌PBS洗涤2次。最后,向各孔加入90 μL完全培养基和10 μL MTT溶液,继续在恒温培养箱中孵育4 h,取出,每孔加入110 μL Formazan溶解液,在摇床上低速振荡10 min,用酶标仪在490 nm处检测吸光度值。

1.2.3 动物造模

将复苏后的H22小鼠肝癌细胞配制成5×10⁷个/mL的细胞悬液,腹腔注射200 μL于小鼠体内,在25℃洁净环境下饲养7 d,待小鼠腹腔形成含有H22细胞的腹水后,抽取腹水于离心管中,1 000 r/min离心5 min,用0.9%生理盐水洗涤2次,弃上清,用0.9%生理盐水重悬为含1×10⁷个/mL的细胞悬液,小鼠背部皮下注射200 μL,饲养6 d左右,明显可见接种部位形成70 mm³的瘤块,表明肿瘤模型构建成功,可用于后续实验。

1.2.4 探针在肿瘤成像中的应用

1.2.4.1 肿瘤诊断

以 0.9%生理盐水为溶剂,将 CS-UCNPs-Tm 探针配制成 5 mg/mL 的溶液。选取 3 只肿瘤大小相同的荷瘤小鼠,尾静脉注射 0.2 mL 探针溶液后,分别置于小动物活体成像系统中进行成像,分别于 15、30 min,1、2、4、8、12、16、24、36、48 和 72 h 观察并比较探针在小鼠体内的成像情况,考察探针 CS-UCNPs-Tm 的肿瘤靶向性及其在肿瘤部位的代谢情况。激发波长为 980 nm,接收波长为 800 nm。

选取 5 组荷瘤小鼠,每组 3 只,各组间肿瘤体积依次增大。同时尾静脉注射 0.2 mL 质量浓度为 5 mg/mL 的探针溶液,2 h 后使用小动物成像仪进行肿瘤成像。研究荷瘤 KM 小鼠成像大小与肿瘤体积的关系。

1.2.4.2 抗肿瘤药物活性筛选与评价

选取肿瘤体积和体质量基本一致的 15 只荷瘤 KM 小鼠,随机分为 3 组:空白对照组、顺铂组、5-FU 组,每组 5 只。给药组分别以顺铂 2 mg/kg、5-FU 25 mg/kg 的给药剂量隔天腹腔注射 0.2 mL,空白对照组隔天腹腔注射 0.9%生理盐水 0.2 mL。每天对小鼠的体质量和肿瘤体积进行测量,观察它们的变化,持续 10 d 后,每只小鼠经尾静脉注射 0.2 mL 质量浓度为 5 mg/mL 的探针 CS-UCNPs-Tm,麻醉后

置于小动物活体成像仪中,观察并比较探针在 3 组 KM 小鼠的成像情况。成像结束后,解剖 3 组小鼠,取出皮下肿瘤,测量肿瘤体积,结合活体成像结果,探讨 CS-UCNPs-Tm 探针在评价抗肿瘤药物的活性方面的应用价值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件。所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用重复测量数据的方差分析比较不同处理因素作用后不同时间点细胞活力和荧光辐射率差异,及抑瘤率和小鼠体质量差异;小鼠肿瘤体积和光辐射效率的比较采用单因素方差分析和非配对学生 *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 探针结构表征

通过溶剂热法合成的上转换纳米粒子 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}$ 呈六方相,形貌均一,尺寸在 35 nm 左右;核壳结构材料 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}@\text{NaYF}_4$ 的壳层厚度约为 3~4 nm,粒径均匀。为了将纳米材料转移到水相中进行后续反应,本研究对 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}@\text{NaYF}_4$ 进行 PAA 衍生化处理,得到了 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}@\text{NaYF}_4@ \text{PAA}$,分散性良好。见图 1。

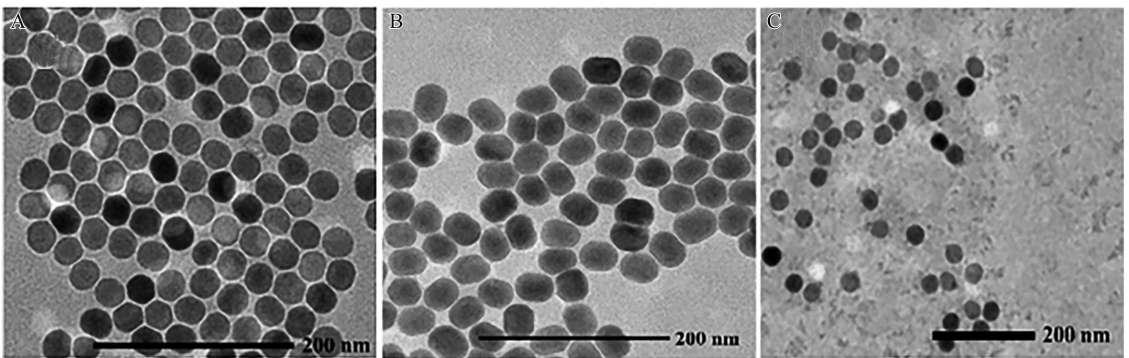


图 1 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}$ (A)、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}@\text{NaYF}_4$ (B)和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}@\text{NaYF}_4@ \text{PAA}$ (C)的电镜图(标尺为 200 nm)
Figure 1 TEM images of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}$ (A), $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}@\text{NaYF}_4$ (B) and $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}@\text{NaYF}_4@ \text{PAA}$ (C) (scale= 200 nm)

对衍生化前后的结构进行 FTIR 表征,结果显示,与 OA 包覆的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}@\text{NaYF}_4$ 相比, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}@\text{NaYF}_4@ \text{PAA}$ 材料在 2855.01 cm^{-1} 和 2924.64 cm^{-1} 附近的 C-H 键伸缩振动吸收峰减弱,并且在 1716.79 cm^{-1} 附近产生了新的 C=O 键的伸缩振动峰,表明 PAA 成功包覆在 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{TM}@\text{NaYF}_4$ 表面。见图 2A。

CS 和 CS-ADH 的 FTIR 表征结果显示,与 CS 相比,CS-ADH 的 C=O 伸缩震动由 1603.19 cm^{-1} 偏

移到 1649.71 cm^{-1} ,同时在 1551.85 cm^{-1} 处出现了 -N-H 的弯曲振动峰,这是 CS 和 CS-ADH 通过酰胺反应生成酰胺键的结果,见图 2B。另外, ^1H NMR 图显示,CS 中峰 a 的化学位移为 1.94,代表 CS 中乙酰甲基中的 H,化学位移在 3.50~4.67 范围内的峰是 CS 糖环骨架的 H;CS-ADH 中峰 b 和峰 c 代表 ADH 中两个亚甲基上的 H,原 CS 上 H 的化学环境发生了变化,化学位移也发生了变化。所以综上可以判断 CS 和 ADH 实现了成功偶联,见图 3。

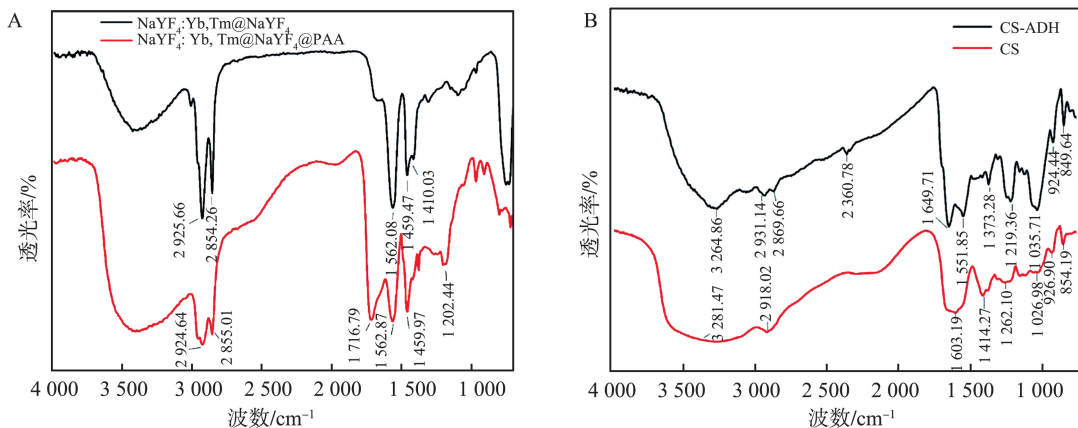


图2 FTIR图

A: NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄ 和 NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄@PAA; B: CS 和 CS-ADH。

Figure 2 FTIR spectroscopy spectra

A: NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄ and NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄@PAA; B: CS and CS-ADH.

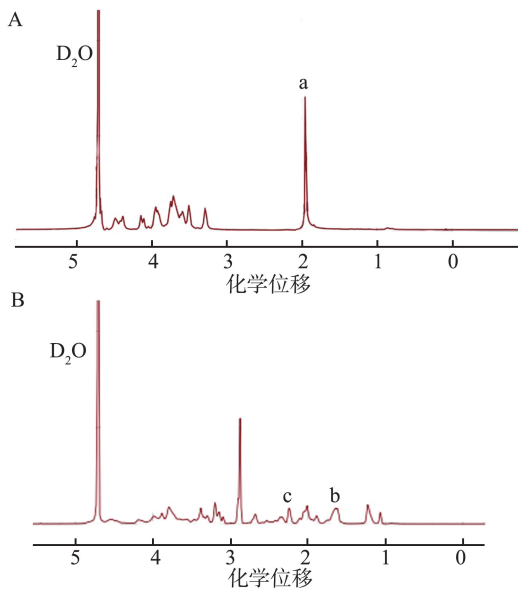


图3 CS(A)和CS-ADH(B)的¹H NMR图

Figure 3 ¹H NMR spectra of CS(A) and CS-ADH(B)

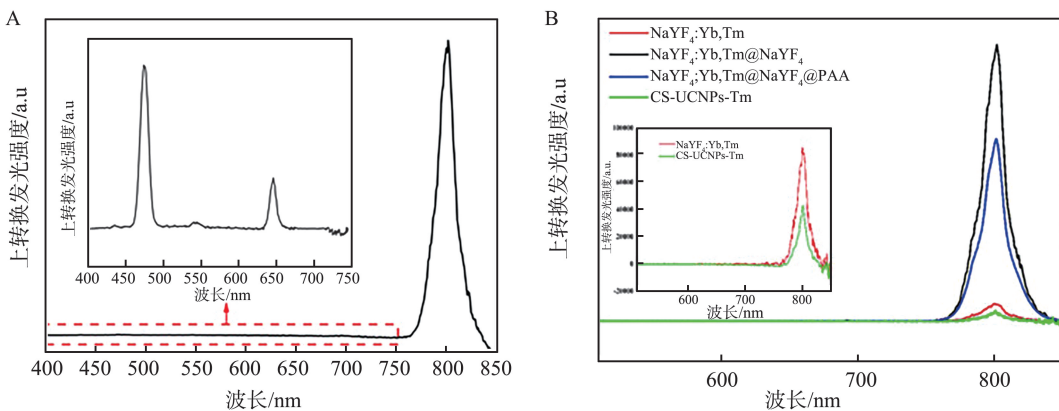


图4 上转换发光图($\lambda_{ex}=980\text{ nm}$)

A: NaYF₄: Yb, Tm; B: NaYF₄: Yb, Tm, NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄, NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄@PAA 和 CS-UCNPs-Tm。

Figure 4 The UCL spectra ($\lambda_{ex}=980\text{ nm}$)

A: NaYF₄: Yb, Tm; B: NaYF₄: Yb, Tm, NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄, NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄@PAA and CS-UCNPs-Tm.

2.2 探针光学性质表征

荧光光谱结果显示,经 980 nm 激发,NaYF₄: Yb, Tm 的发射带主要集中在 475、650 以及 800 nm 附近,分别对应于 1D₂→3F₄、1D₂→3H₅、1G₄→3F₄ 的能级跃迁,见图 4A。与 NaYF₄: Yb, Tm 相比,核壳结构 NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄ 上转换发光强度显著增强,约为单核材料的 17 倍,PAA 衍生转水后,发射带位置没有明显变化,强度虽稍有减弱,但仍远强于纳米材料 NaYF₄: Yb, Tm 的上转换发光强度,见图 4B。与 CS-ADH 偶联后,材料的上转换发光强度明显减弱,但与本课题组前期合成的 CS-NaYF₄: Yb, Er@PAA 相比,其发光强度明显增强,峰形比约为 35:1,最强峰的波长由 545 nm 附近红移至 800 nm 左右,更适合小动物活体成像,见图 5。

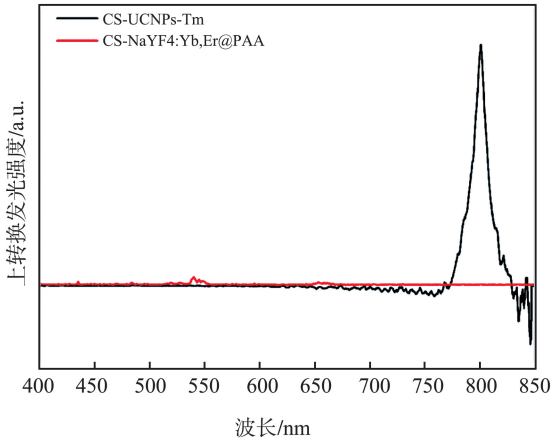


图5 CS-NaYF₄:Yb,Er@PAA和CS-UCNPs-Tm(λ_{ex} =980 nm)上转换发光强度比较

Figure 5 The comparison of UCL intensity between CS-NaYF₄:Yb,Er@PAA and CS-UCNPs-Tm (λ_{ex} =980 nm)

2.3 细胞毒性试验

在10~500 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内,CS-UCNPs-Tm与Bel-7402细胞分别共孵育12和24 h后,细胞存活率均在60%以上,且当探针质量浓度在5~25 $\mu\text{g/mL}$ 时,12 h组的细胞存活率高于24 h组($F_{\text{组间}}=14.971, P=0.008; F_{\text{质量浓度}}=34.438, P<0.001; F_{\text{交互}}=4.928, P=0.005$)。见图6。

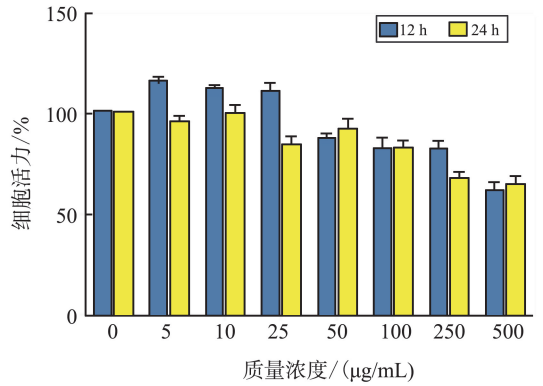


图6 Bel-7402细胞与CS-UCNPs-Tm分别孵育12和24 h的细胞活力

Figure 6 Cell viability of Bel-7402 cells incubated with CS-UCNPs-Tm for 12 and 24 h, respectively

2.4 肿瘤成像

尾静脉注射探针30 min后,肿瘤部位开始出现明显的上转换发光,在2 h时达到最大值后逐渐下降,在48 h时略有上升,随后持续下降,72 h后肿瘤部位的上转换发光强度较弱。因此,尾静脉注射2 h为探针检测的最佳时间点。同时,与非肿瘤部位的发光对比可知,所制备的CS-UCNPs-Tm探针具有良好的肿瘤靶向性。另外,由于探针的非特异性摄取,易在肺部积聚,所以在小鼠的脖颈处也出现了一定程度的发光,见图7。

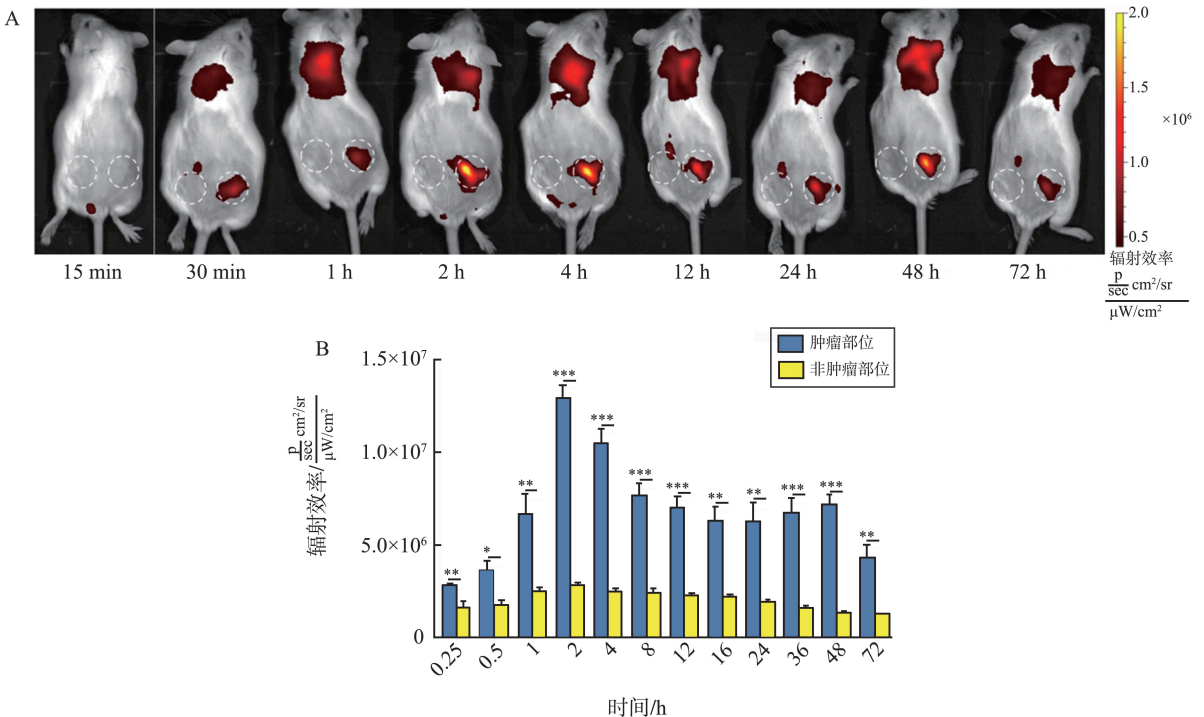


图7 尾静脉注射CS-UCNPs-Tm探针后,荷瘤小鼠在不同时间的成像(A)和荧光辐射效率(B) ($F_{\text{肿瘤部位}}=3.516, P=0.197; F_{\text{非肿瘤部位}}=15.962, P=0.023; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001$)

Figure 7 Imaging (A) and radiant efficiencies (B) of tumor bearing mice at different time points after tail vein injection of CS-UCNPs-Tm probes ($F_{\text{tumor site}}=3.516, P=0.197; F_{\text{non-tumor site}}=15.962, P=0.023; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001$)

将探针 CS-UCNPs-Tm 尾静脉注射到不同瘤体积的荷瘤 KM 小鼠体内,发现肿瘤部位的上转换发光强度与小鼠肿瘤体积的变化趋势一致,说明探针

的上转换发光强度在一定程度上可以反映肿瘤的大小,见图 8。

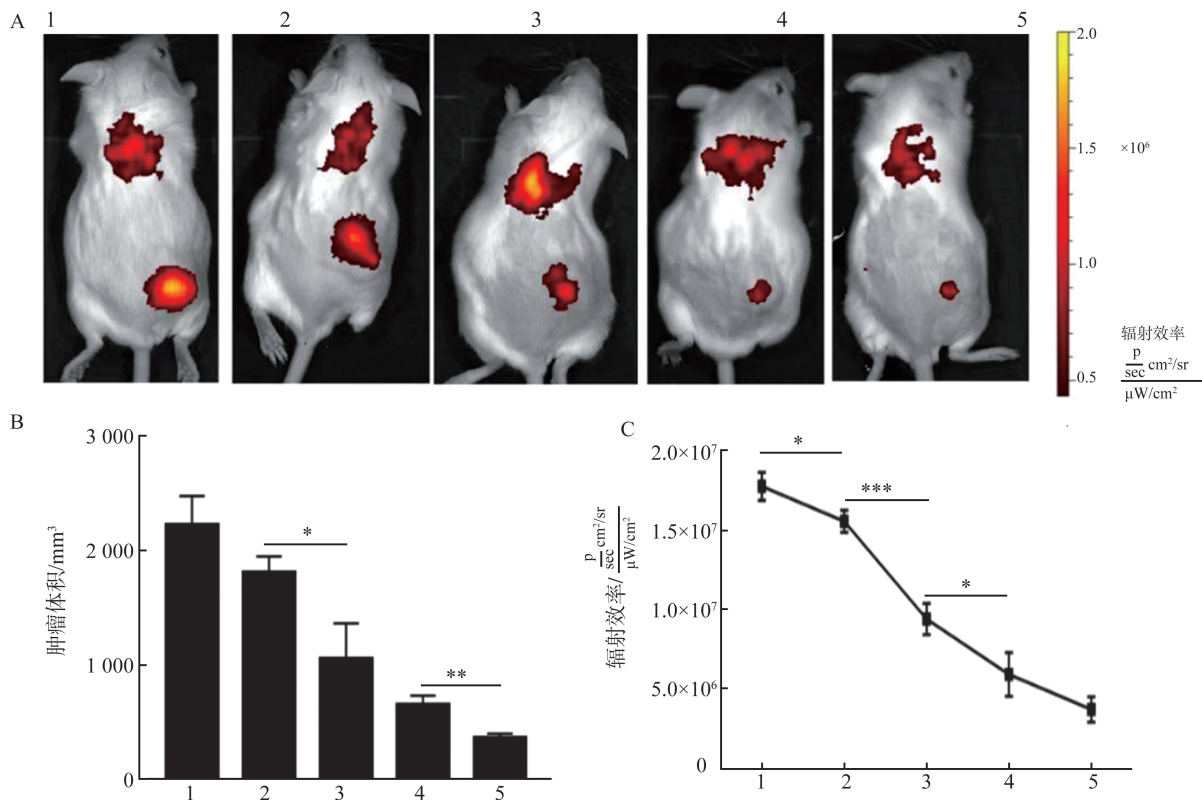


图 8 五组荷瘤 KM 小鼠的荧光成像图(A)、肿瘤体积(B) ($F=114.131, P<0.001; *P<0.05, **P<0.01$) 和荧光辐射效率(C) ($F=49.35, P<0.001; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001$)

1,2,3,4,5 分别代表小鼠肿瘤体积为 2 229、1 815、1 059、656、366 mm³。

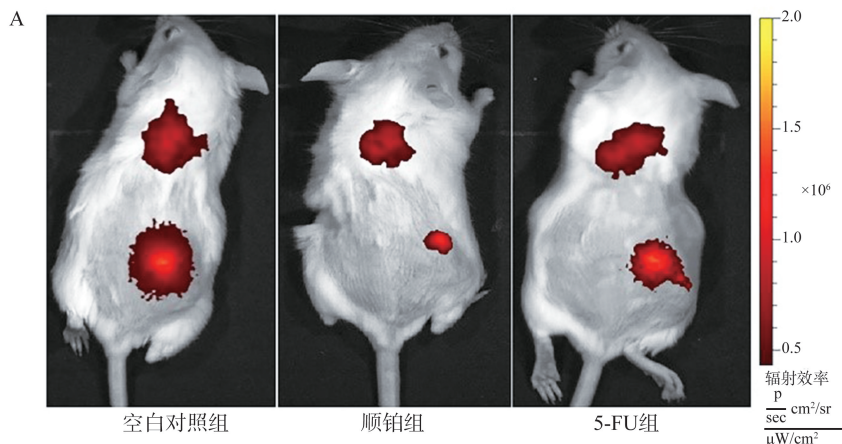
Figure 8 Fluorescence imaging images (A), tumor sizes (B) ($F=114.131, P<0.001; *P<0.05, **P<0.01$) and radiant efficiencies (C) ($F=49.35, P<0.001; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001$)

The tumor volumes of the mouse in groups 1,2,3,4 and 5 were 2,229, 1,815, 1,059, 656, and 366 mm³, respectively.

2.5 抗肿瘤药物活性比较

与空白对照组相比,顺铂组和 5-FU 组肿瘤部位上转换发光强度减弱,同时小鼠肿瘤体积明显减小($F_{组间}=13.675, P<0.001; F_{时间}=47.274, P<0.001; F_{交互}=15.208, P<0.001$),结合小鼠的肿瘤体积和活体成像图,顺铂组和 5-FU 组具有明显的抗肿瘤活

性,而且顺铂的抗肿瘤活性更好。另外,各组小鼠体质量变化曲线表明,顺铂组小鼠的体质量出现明显下降($F_{组间}=1.516, P=0.249; F_{时间}=12.42, P<0.001; F_{交互}=21.848, P<0.001$),说明顺铂对小鼠影响较大,见图 9。



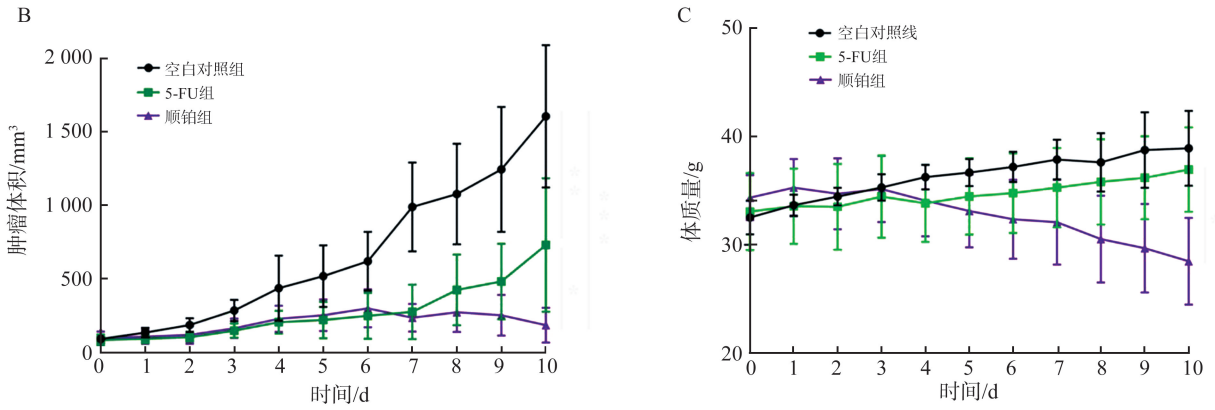


图9 空白对照组、顺铂组和 5-FU 组荷瘤 KM 小鼠尾静脉注射 CS-UCNPs-Tm 探针的成像图像 (A)、肿瘤体积 (B) 和小鼠体重变化曲线 (C)

Figure 9 The imaging images (A), tumor volumes (B) and weight change curves (C) of tumor-bearing KM mice injected with CS-UCNPs-Tm probe through the tail vein in the blank control group, cisplatin group and 5-FU group

3 讨论

UCNPs 是目前流行的具有优异光学性能的纳米材料。上转换发光是指材料吸收一个或多个低能光子并辐射一个高能光子的非线性发光现象,通常是指将近红外光转换为可见光。与荧光染料和量子点相比,反斯托克斯发射消除了生物或环境样品基质中的背景自发荧光^[8-10],具有低毒性、生物相容性和较强组织穿透力等优点,在荧光探针靶向标记、生物检测、生物活体成像和肿瘤治疗等方面具有巨大的发展和应用前景^[11-14]。研究表明,肿瘤组织中肿瘤干细胞的存在是肿瘤形成、侵袭和转移的重要原因^[15]。肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)与 HCC 的形成、进展和复发密切相关^[16]。作为 LCSCs 的生物标志物^[17],CD44 分子在 HCC 细胞中的表达高于癌旁组织和正常肝组织,其上调与 HCC 的分化程度、癌症进展和预后密切相关^[18-24]。因此,CD44 可以作为肝癌的生物标志物。研究发现,CS 是 CD44 的一种特殊配体。CS 是一种糖胺聚糖,由葡糖醛酸和 N-乙酰半乳糖胺重复二糖单元组成,可通过软骨素链与 CD44 相互作用^[25-28]。

本研究构建了基于核壳结构 NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄ 上转换纳米材料的 CS 多糖探针 (CS-UCNPs-Tm)。与 NaYF₄: Yb, Tm 相比,核壳结构 NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄ 的发光强度明显增强,这主要是由于壳层的钝化,减少了内核荧光的外部猝灭。核壳结构材料经 PAA 修饰后,可以分散在水中,且其发射带位置未发生明显变化。虽然修饰后材料的发光强度相较于核壳结构有所减弱,但仍强于单核纳米材料。与 NaYF₄: Yb, Tm@NaYF₄@PAA 相比,

CS-UCNPs-Tm 的发光强度明显减弱。这是由于在相同的质量浓度下,CS-UCNPs-Tm 的分子量较大,含有的稀土元素浓度降低。稀土元素 Tm 与 Er 相比,最强发射波长由 545 nm 红移到 800 nm,更适用于体内成像。

MTT 实验结果表明,制备的 CS-UCNPs-Tm 探针即使在浓度高达 500 μg/mL 时,与 Bel-7402 共孵育 24 h 后的细胞存活率也在 60% 以上,表明制备的 CS-UCNPs 探针具有良好的细胞相容性,可以用于体外及体内实验。

肿瘤成像结果表明,构建的 CS-UCNPs-Tm 探针可以区分肿瘤区域和正常组织,具有良好的肿瘤靶向性,且肿瘤部位的上转换发光强度和发光范围跟肿瘤体积大小相关,说明该探针具有指示肿瘤的发生和发展的作用。这对于肿瘤的早筛和预后评估具有重要的意义,也预示着发展的探针在活体成像方面具有良好的应用前景。

肿瘤可视化技术在药物活性筛选和评价中发挥着重要作用,它提供了一种直观、准确的方法来监测肿瘤的生长和变化,从而评价药物对肿瘤的影响。本研究对荷瘤小鼠注射不同抗肿瘤药物,与空白对照组相比,各用药组的荧光强度降低,瘤体积减小,成像强度和区域大小与肿瘤的体积呈现一致的变化趋势,因此该合成探针可用于评价不同抗肿瘤药物的活性。这一结果可以为探针用于抗肿瘤化合物的活性筛选提供可行性参考。

综上所述,本研究所构建的上转换纳米探针 CS-UCNPs-Tm 具有良好的发光性能,可以实现活体肿瘤成像,可以对建立可视化的肿瘤诊断方法和 HCC 的早期筛查提供参考。

参考文献:

- [1] Zhao WY, Liu XP. miR-3682 promotes the progression of hepatocellular carcinoma (HCC) via inactivating AMPK signaling by targeting ADRA1A[J]. *Ann Hepatol*, 2022, 27(Suppl 1): 100570. doi:10.1016/j.aohep.2021.100570
- [2] Chen Y, Hou XG, Li DP, et al. Development of a CLDN18.2-targeting immuno-PET probe for non-invasive imaging in gastrointestinal tumors[J]. *J Pharm Anal*, 2023, 13(4): 367-375.
- [3] Duan QJ, Zhao ZY, Zhang YJ, et al. Activatable fluorescent probes for real-time imaging-guided tumor therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, 196: 114793. doi:10.1016/j.addr.2023.114793
- [4] Li CS, Lin Q, Hu FR, et al. Based on lapatinib innovative near-infrared fluorescent probes targeting HER1/HER2 for *in vivo* tumors imaging [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 214: 114503. doi: 10.1016/j.bios.2022.114503
- [5] Li H, Yue LZ, Huang HW, et al. A NIR emission fluorescence probe for visualizing elevated levels of SO₂ in cancer cells and living tumor [J]. *J Photochem Photobiol A Chem*, 2023, 441: 114684. doi:10.1016/j.jphotochem.2023.114684
- [6] Wang Y, Ma T, Dong JQ. Design and synthesis of a new near-infrared and large Stokes shift fluorescence probe for NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 detection in living systems [J]. *Dyes Pigm*, 2023, 210: 110981. doi:10.1016/j.dyepig.2022.110981
- [7] Sivaiah A, Prusty S, Parandhama A. Synthesis and surface modification of ultrasmall monodisperse NaYF₄: Yb³⁺/Tm³⁺ upconversion nanoparticles [J]. *J Indian Chem Soc*, 2023, 100(5): 100990. doi:10.1016/j.jics.2023.100990
- [8] Jin BR, Du ZG, Ji JC, et al. Regulation of probe density on upconversion nanoparticles enabling high-performance lateral flow assays [J]. *Talanta*, 2023, 256: 124327. doi: 10.1016/j.talanta.2023.124327
- [9] Naher HS, Ali Hussein Al-Turaihi B, Mohammed SH, et al. Upconversion nanoparticles (UCNPs): synthesis methods, imaging and cancer therapy [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2023, 80: 104175. doi: 10.1016/j.jddst.2023.104175
- [10] Song YQ, Chen M, Han L, et al. A novel ADA-coated UCNPs@NB sensing platform combined with nucleic acid amplification for rapid detection of *Escherichia coli* [J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1239: 340751. doi:10.1016/j.aca.2022.340751
- [11] Chen GB, Li YH, Liu JL, et al. Anti-stokes luminescent organic nanoparticles for frequency upconversion biomedical imaging [J]. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 2023, 50: 102668. doi:10.1016/j.nano.2023.102668
- [12] Gülleryüz B, Uğur Ü, Gülsoy M. Near infrared light activated upconversion nanoparticles (UCNP) based photodynamic therapy of prostate cancers: an *in vitro* study [J]. *Photodiagn Photodyn Ther*, 2021, 36: 102616. doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102616
- [13] Liu B, Ge YH, Lu YH, et al. An NIR light-responsive "on-off-on" photoelectrochemical aptasensor for carcino-embryonic antigen assay based on Y-shaped DNA [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 229: 115241. doi:10.1016/j.bios.2023.115241
- [14] Zhang Y, Luo D, Zhang Y, et al. DNAzymes-conjugated upconversion nanoamplicon for *in situ* ultrasensitive detection and imaging of microRNA *in vivo* [J]. *Chem Eng J*, 2023, 454: 140489. doi: 10.1016/j.cej.2022.140489
- [15] Lee HS, Kang NW, Kim H, et al. Chondroitin sulfate-hybridized zein nanoparticles for tumor-targeted delivery of docetaxel [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 253: 117187. doi:10.1016/j.carbpol.2020.117187
- [16] Moto M, Takamizawa N, Shibuya T, et al. Anti-diabetic effects of chondroitin sulfate on normal and type 2 diabetic mice [J]. *J Funct Foods*, 2018, 40: 336-340. doi: 10.1016/j.jff.2017.11.019
- [17] Zhu QY, Lin LZ, Zhao MM. Sulfated fucan/fucosylated chondroitin sulfate-dominated polysaccharide fraction from low-edible-value sea cucumber ameliorates type 2 diabetes in rats: new prospects for sea cucumber polysaccharide based-hypoglycemic functional food [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 159: 34-45. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.05.043
- [18] Guo JY, Chiu CH, Wang MJ, et al. Proteoglycan serglycin promotes non-small cell lung cancer cell migration through the interaction of its glycosaminoglycans with CD44 [J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1): 2. doi:10.1186/s12929-019-0600-3
- [19] Nisha R, Kumar P, Kumar U, et al. Assessment of hyaluronic acid-modified imatinib mesylate cubosomes through CD44 targeted drug delivery in NDEA-induced hepatic carcinoma [J]. *Int J Pharm*, 2022, 622: 121848. doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121848
- [20] Pan HC, Xue WK, Zhao WJ, et al. Expression and function of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in human glioma [J]. *FASEB J*, 2020, 34(2): 2853-2868.