



新型光敏纳米粒子的制备及其在肿瘤光动力治疗中的应用

郭梦舟, 刘欢, 李彤, 余一祎

引用本文:

郭梦舟, 刘欢, 李彤, 等. 新型光敏纳米粒子的制备及其在肿瘤光动力治疗中的应用[J]. 中国临床医学, 2024, 31(4): 577-585.

GUO M Z, LIU H, LI T, et al. Preparation and application of novel photosensitive nanoparticles in tumor photodynamic therapy[J]. Chin J Clin Med, 2024, 31(4): 577-585.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2024.20240435>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

训练免疫在肿瘤综合治疗中的应用研究进展

Research progress on trained immunity in tumor multimodality therapy

中国临床医学. 2023, 30(5): 861-869 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2023.20231381>

新冠病毒疫情期间信息化在葡萄酒色斑光动力治疗中的优势探讨

Discussion on the advantages of informatization in photodynamic therapy of port-wine stains during Covid-19

中国临床医学. 2021, 28(12月增刊): <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210594>

新型自体T细胞回输治疗晚期实体肿瘤的安全性及疗效分析

The safety and efficacy of a novel autologous T cell therapy for advanced malignant solid tumors

中国临床医学. 2021, 28(5): 808-812 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210594>

靶向谷氨酰胺代谢治疗肿瘤及改善肿瘤微环境研究进展

Research progress in targeting glutamine metabolism for tumors therapy and improvement of tumor microenvironment

中国临床医学. 2024, 31(2): 262-273 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2024.20240228>

介入技术在腹膜后肿瘤临床诊疗中的应用进展

Clinical application progress of interventional diagnosis and treatment for retroperitoneal tumor

中国临床医学. 2021, 28(2): 323-327 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20201778>

KRAS基因突变亚型对直肠癌新辅助治疗后肿瘤退缩的影响

Effects of KRAS mutation variants on tumor regression grade of rectal cancer received neoadjuvant therapy

中国临床医学. 2024, 31(3): 389-393 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2024.20240246>

DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2024.20240435

· 论 著 ·

新型光敏纳米粒子的制备及其在肿瘤光动力治疗中的应用



郭梦舟¹, 刘欢², 李彤^{3*}, 余一祎^{1*}

1. 复旦大学附属中山医院肿瘤内科, 上海 200032
2. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050
3. 复旦大学附属中山医院肝肿瘤内科, 上海 200032

[摘要] 目的 制备一种新型光敏纳米粒子, 并评价其理化性质及探讨其对肿瘤光动力治疗疗效的影响。方法 将5,15-二溴-10,20-二苯基卟啉(5, 15-dibromo-10, 20-diphenylporphine, DBN)、四氟对苯二腈(tetrafluoroterephthalonitrile, TFN)、两亲性聚合物甲基-PEG-DSPE(DSPE-MPEG2000, PEG)混合溶解于四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)中, 通过纳米共沉淀法制备新型光敏纳米粒子(DBN/TFN@PEG), 并检测其理化性质。采用660 nm激光持续照射新型及传统纳米粒子, 通过荧光光谱仪检测不同照射时间下纳米粒子的荧光发光强度即产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平。将新型及传统纳米粒子与肿瘤细胞共孵育并通过660 nm激光照射, 使用免疫荧光法检测肿瘤细胞内ROS水平, 采用PI/Calcein-AM染色法检测死/活肿瘤细胞比例。结果 制备后的DBN/TFN@PEG水合粒径约为107.8 nm, 分散均匀。DBN/TFN@PEG较传统纳米粒子具备更强的ROS产生能力($P<0.01$)。免疫荧光结果显示, 在激光照射条件下, DBN/TFN@PEG较传统纳米粒子更能诱导肿瘤细胞产生ROS($P<0.01$)。PI/Calcein-AM染色结果显示, DBN/TFN@PEG组死肿瘤细胞比例显著高于传统纳米粒子组($P<0.01$)。结论 DBN/TFN@PEG理化性质稳定, 分布均匀, 作为光敏剂具备更强的诱导肿瘤细胞产生ROS的能力, 可提高光动力治疗的抗肿瘤疗效。

[关键词] 光动力治疗; 光敏剂; 纳米粒子; 活性氧; 肿瘤

[中图分类号] R73-36 **[文献标志码]** A

Preparation and application of novel photosensitive nanoparticles in tumor photodynamic therapy

GUO Mengzhou¹, LIU Huan², LI Tong^{3*}, YU Yiyi^{1*}

1. Department of Medical Oncology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China
2. Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China
3. Department of Hepatic Oncology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective** To prepare a novel photosensitive nanoparticle and to evaluate its physicochemical properties, and effect on the efficacy of photodynamic therapy. **Methods** 5,15-dibromo-10,20-diphenylporphine (DBN), tetrafluoroterephthalonitrile (TFN), and the amphiphilic polymer methoxy-polyethylene glycol-distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE-MPEG2000, PEG) were dissolved in tetrahydrofuran (THF) by co-precipitation method to prepare novel photosensitive nanoparticles, named DBN/TFN@PEG. The physicochemical properties of DBN/TFN@PEG were characterized. Both novel and conventional nanoparticles were continuously irradiated with a 660 nm laser, and the fluorescence intensity of nanoparticles, representing reactive oxygen species (ROS) production levels, was measured using a fluorescence spectrophotometer at different irradiation times. Tumor cells were co-incubated with the nanoparticles and irradiated with a 660 nm laser. ROS levels within the tumor cells were detected using immunofluorescence, and the ratio of dead to live tumor cells was determined using PI/Calcein-AM staining. **Results** Prepared DBN/TFN@PEG nanoparticles with hydrated particle size of approximately 107.8 nm were uniformly distributed in the solution. Compared to conventional nanoparticles, the ROS production capacity of DBN/TFN@PEG was significantly higher ($P<0.01$). Immunofluorescence results showed that the generation of ROS levels in the tumor cells of DBN/TFN@PEG group were

[收稿日期] 2024-04-22 **[接受日期]** 2024-08-02

[基金项目] 国家自然科学基金(82102761), 上海市青年科技英才扬帆计划(23YF1441200), 复旦大学附属中山医院青年基金项目(2021ZSQN49). Supported by National Natural Science Foundation of China (82102761), Shanghai Youth Science and Technology Talents Sailing Program (23YF1441200) and Young Scientists Fund of Zhongshan Hospital, Fudan University (2021ZSQN49).

[作者简介] 郭梦舟, 博士, 住院医师. E-mail: guo.mengzhou@zs-hospital.sh.cn

*通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-64041990, E-mail: yu.yiyi@zs-hospital.sh.cn; E-mail: li.tong@zs-hospital.sh.cn

significantly higher than in the conventional nanoparticles group under laser irradiation ($P < 0.01$). PI/Calcein-AM staining results indicated a significantly higher ratio of dead tumor cells in the DBN/TFN@PEG group compared to the conventional nanoparticle group ($P < 0.01$). **Conclusions** DBN/TFN@PEG has stable physicochemical properties and uniform distribution in the solution. As effective photosensitizers, DBN/TFN@PEG can exhibit stronger ability to induce ROS generation in tumor cells, and may enhance the efficacy of photodynamic therapy in cancer.

[Key Words] photodynamic therapy; photosensitizer; nanoparticles; reactive oxygen species; tumor

恶性肿瘤已成为 21 世纪严重威胁人类健康的主要公共卫生问题。全球癌症数据显示, 2022 年新发癌症病例近 2 000 万, 其中中国新发癌症 480 万人, 位居全球第一, 占比约为 24%; 全球癌症死亡病例约为 970 万, 中国癌症死亡人数约 260 万, 同样位居全球第一, 占比约为 26.8%^[1]。面对肿瘤对我国人群身心健康构成的严峻威胁, 寻找高效、低毒、经济的治疗手段迫在眉睫。

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是细胞正常的代谢产物, 主要包括超氧阴离子 (superoxide anion, $\cdot\text{O}_2^-$)、过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2)、羟基自由基 (hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$) 和单线态氧 (singlet oxygen, $^1\text{O}_2$) 等, 其浓度决定着细胞内氧化-还原环境是否持动态平衡。对于肿瘤来说, ROS 是一把双刃剑。低水平 ROS 可以通过调节 PI3K/AKT、MAPK、NF- κ B 等信号通路促进肿瘤细胞增殖和侵袭; 但超过阈值的 ROS 会引起生物大分子如蛋白质、脂类和核酸的氧化损伤, 从而诱导肿瘤细胞死亡^[2]。因此, 诱导肿瘤局部产生高水平 ROS 是提高肿瘤治疗效的可行策略。

光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 是一种新型的肿瘤治疗手段, 它主要依赖光敏剂 (photosensitizers, PSs) 吸收光子后发生电子转移从而产生高毒性的 ROS, 进而促进肿瘤细胞的凋亡和坏死^[3]。PDT 利用外部激发源在肿瘤局部产生 ROS, 具有无创性、特异性高和生物安全性好的优势, 目前已在包括膀胱癌^[4]、胃癌^[5]和肺癌^[6]等多种类型的肿瘤中得到应用。

然而, 当前大部分传统 PSs 普遍面临不可降解性、稳定性不够、产生 ROS 有限和光热转化效率低等问题^[7-8]。传统有机光敏剂多见于酞菁类^[9]、吩噻嗪^[10]、卟啉及其衍生物等, 其中以卟啉类研究最为广泛^[11-12]。5,15-二溴-10,20-二苯基卟啉

(5,15-dibromo-10,20-diphenylporphine, DBN) 是卟啉及其衍生物的一种, 有良好的光物理性质, 在激光的照射下能够产生少量的 ROS, 具有一定的 PDT 性能。然而, 和多数传统光敏剂的缺陷一样, DBN 具有较大的平面结构, 在溶液中易发生聚集诱导荧光猝灭现象, 这种特征削弱了其产生 ROS 的能力。此外, DBN 也难溶于水, 不易于在生物体内聚集, 从而限制了其在 PDT 的应用^[13]。

近年来, 具有供体-受体 (donor-acceptor, D-A) 结构的新有机 PSs 受到诸多科研工作者的青睐。这类化合物有典型的分子内电荷转移特性, 有利于促进吸收和发射波长红移、降低单重态-三重态能隙 ($\Delta\text{ES-T}$)、促进系间穿越并激活光动力性能, 含有 D-A 结构的有机光敏剂被认为是最具有潜力的生物纳米材料之一。然而, 寻找一种合适高效的 D-A 分子也需要复杂的合成方法。文献^[14-16]显示, 引入合适的受体分子 (是指极度缺少电子的一类有机化合物分子), 将有利于增强有机分子的发光性能。四氟对苯二腈 (tetrafluoroterephthalonitrile, TFN) 有氰基和氟原子的双官能团分子结构, 使得整个分子电子极度缺失, 是一种理想的受体分子, 又因其有良好的平面结构, 常被用于提高有机化合物的发光性能^[17]。通过引入 TFN 往往能够使有机分子发生分子内电荷转移, 从而增加有机分子的吸光能力, 使得更容易被光激发; 同时, TFN 含有丰富的氟原子和氰基, 这有利于增强 DBN 在水中的稳定性以及生物相容性。

为了寻找到一种更加简洁高效的 PSs 材料, 本研究创新性地将受体单元 TFN 引入 DBN, 利用分子间的氢键使 DBN 与 TFN 形成稳定的 D-A 结构, 同时为了使其具有更好的生物相容性, 本研究采用纳米共沉淀法用两亲性聚合物甲基-PEG-DSPE (DSPE-MPEG2000, PEG) 包裹疏水的 DBN/TFN 纳米颗粒, 得到新型纳米颗粒即

DBN/TFN@PEG, 并初步探讨该纳米颗粒的理化性质及其作为 PSs 的 PDT 性能。

1 材料与方法

1.1 试剂和细胞系 胎牛血清、1640 培养基、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 和胰酶购自 Biosharp 公司; ROS 检测试剂盒购自碧云天; 死/活细胞双染试剂盒 (PI/ Calcein-AM) 购自上海贝博生物; DBN 购自乐研试剂; TFN、PEG、二氢罗丹明 123 (dihydrorhodamine 123, DHR 123)、磷酸盐吐温缓冲液 (PBS-Tween-20 solution, PBST)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、甲醇、四氢呋喃 (tetrahydrofuran, THF) 购自泰坦科技探索平台; 4T1 小鼠乳腺癌细胞购自武汉普诺赛生物。

1.2 仪器设备 CO₂ 恒温培养箱购自北京桑翌实验仪器研究所; 超净工作台购自上海笃特科学仪器有限公司; 离心机购自上海卢湘仪离心机仪器有限公司; 共聚焦激光显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM)、透射电子显微镜 TEM (JEOL JEM 2100F)、纳米粒度及 Zeta 电位分析仪 (Malvern Zetasizer Nano ZS90) 由科学指南针测试平台提供; 激光器 (660 nm)、磁力加热搅拌器 (IKA RCT digital)、加热型超声波清洗器 (UC-2H)、紫外-可见光吸收光谱仪 (JASCO V-670)、荧光光谱仪 (HORIBA Fluoromax Plus) 由上海微系统与信息技术研究所提供; 理论建模及轨道计算 (Gaussian、ORCA) 由科学指南针测试平台提供; ¹H NMR 测试由中国科学院上海有机化学研究所测试中心提供。

1.3 纳米粒子制备方法 将 6.2 mg DBN、20 mg PEG 溶于 5 mL THF 中, 加入正在超声的 45 mL 去离子水中, 继续超声 10 min, 超声结束以后将混合溶液置于通风橱, 使用磁力搅拌器剧烈搅拌 24 h, 待搅拌结束后, 采用水性滤膜 (孔径 200 μm) 过滤。将溶液放置备用, 得到的纳米粒子溶液即为 DBN@PEG, 浓度为 200 μmol/L; 同样, 将 6.2 mg DBN、2 mg TFN 和 20 mg PEG, 全部溶于 5 mL THF 中, 按照上述方法制备的纳米粒子溶液即为 DBN/TFN@PEG, 浓度为 200 μmol/L。

1.4 理化性质检测 通过紫外-吸收光谱仪测试 DBN@PEG、DBN/TFN@PEG 纳米粒子溶液的光密度和吸收波长; 通过荧光光谱仪测试 DBN@PEG、DBN/TFN@PEG 纳米粒子溶液的荧光发射强度和发射波长; 通过动态光散射检测 DBN@PEG 和 DBN/TFN@PEG 纳米粒子在溶液中的尺寸, 并通过透射电子显微镜观察纳米粒子的形态。

1.5 激光照射下纳米粒子荧光强度检测 采用荧光染料 DHR-123 检测细胞内 ROS 水平。荧光 ROS 指示剂 DHR123 的配制方法: 取 2.5 mg DHR123 溶于 10 mL 甲醇中, 得到 500 μmol/L 的 DHR123 甲醇溶液, 然后取 100 μL 加入 10 mL PBST 得到 5 μmol/L 的 DHR123 溶液备用。本实验共设置 3 组: (1) 对照组: 将 100 μL 去离子水与 100 μL DHR123 指示剂溶液 (5 μmol/L) 混合, 加入 10 mL 缓冲液 PBST, 得到对照组溶液; (2) DBN@PEG 组: 将 100 μL DBN@PEG 纳米粒子与 100 μL DHR123 指示剂溶液 (5 μmol/L) 混合, 再加入 10 mL 缓冲液 PBST 中; (3) DBN/TFN@PEG 组: 将 100 μL DBN/TFN@PEG 纳米粒子与 100 μL DHR123 指示剂溶液 (5 μmol/L) 混合, 再加入 10 mL 缓冲液 PBST 中。分别取上述 3 组溶液各 3 mL 加入石英比色皿中, 使用 660 nm 激光器照射 2 min、5 min、15 min, 通过荧光光谱仪记录样品的荧光发射强度 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)。

1.6 核磁滴定实验方法 取 3 支核磁管分别加入 6.2 mg (0.01 mmol) DBN, 并加入 0.5 mL 氘代氯仿溶剂中, 然后向核磁管中依次加入 0 mg、2 mg (0.01 mmol)、4 mg (0.02 mmol) TFN, 得到 3 组样品, 送往上海有机化学研究所测试。

1.7 肿瘤细胞 ROS 水平检测 取对数生长期的 4T1 细胞, 进行细胞计数, 调整细胞浓度, 按照 1×10^5 个/孔接种到共聚焦专用培养皿中, 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱中培养过夜, 使细胞贴壁。弃去旧培养基, 将纳米粒子原液 (200 μmol/L) 与细胞完全培养基按 1:9 稀释至浓度为 20 μmol/L, 每孔加入含 20 μmol/L 纳米粒子的完全培养基 2 mL, 继续培养 12 h。移除旧培养基并用 PBS 洗涤 2 次后加入新鲜培养基, 在 660 nm 激光下照射 4T1 细胞

15 min ($100\text{ mW}/\text{cm}^2$), 后再在培养箱中孵育 30 min。按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 ROS 探针 DCFH-DA, 使其终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$, 去除细胞培养基, 于每孔中加入 $1\text{ mL }10\text{ }\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 的无血清培养基, 37°C 细胞培养箱内孵育 20 min。最后, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 通过 CLSM 拍摄。使用 ImageJ 软件分析样品平均荧光强度。

1.8 死/活肿瘤细胞比例检测 取对数生长期的 4T1 细胞, 进行细胞计数, 调整细胞浓度, 按照 1×10^5 个/孔接种到共聚焦专用培养皿中, $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 恒温培养箱中培养过夜, 使细胞贴壁。弃去旧培养基, 将纳米粒子原液 ($200\text{ }\mu\text{mol/L}$) 与细胞完全培养基按 1:9 稀释浓度为 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$, 每孔加入含有 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 纳米粒子的完全培养基 2 mL , 继续培养 12 h。移除旧培养基并用 PBS 洗涤 2 次后加入新鲜培养基, 在 660 nm 激光下照射 4T1 细胞 15 min ($100\text{ mW}/\text{cm}^2$), 后再在培养箱中孵育 30 min。死/活细胞染色液配制: 用染料稀释液 (溶液 C) 分别将试剂 A (Calcein-AM) 和试剂 B (PI) 稀释 10 倍, 即取 $985.5\text{ }\mu\text{L}$ PBS 与 $10\text{ }\mu\text{L}$ 稀释后的试剂 A 和 $4.5\text{ }\mu\text{L}$ 试剂 B 混匀, 现配现用。取出细胞, 去除旧培养基, 用 PBS 清洗细胞 1 次, 按照 $1\text{ mL}/\text{皿}$ 加入染色液, 室温避光孵育 10 min, 去除染色液, 使用 PBS 清洗 3 次终止染色, 通过 CLSM 拍摄。使用 ImageJ 软件分析样品平均荧光强度, 量化死/活细胞, 死/活细胞数量相加为全细胞数量, 死/活细胞数量除以全细胞数量为相对应的比例。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 采用 t 检验进行两组间比较, 单因素方差分析进行多组间比较, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 纳米粒子的理化性质 DBN/TFN@PEG 和 DBN@PEG 的吸收峰完全重合, 吸收峰分别在 390 nm 、 412 nm 、 550 nm 、 670 nm , 其中最大吸收波长为 412 nm (图 1 A)。DBN@PEG 和 DBN/TFN@PEG 的发射峰相似, 存在 2 个最大的

发射波长, 其荧光发射主峰分别位于 480 nm 、 670 nm (图 1 B)。DBN@PEG 在水溶液中的水合粒径约为 201.8 nm , 多分散性指数 (polymer dispersity index, PDI) 为 0.246; DBN/TFN@PEG 在水溶液中的水合粒径约为 107.8 nm , PDI 为 0.257 (图 1 C、图 1 D)。测试结果表明, 与 DBN@PEG 的纳米粒子粒径分布相比, DBN/TFN@PEG 的粒径分布更窄, 2 组都形成了均匀的纳米颗粒。最后, 本研究通过透射电子显微镜观察, 结果显示 DBN@PEG、DBN/TFN@PEG 均表现出均匀的球形形态 (图 1 E—1 F)。

2.2 激光照射下纳米粒子 ROS 水平检测 荧光强度结果 (图 2 A) 显示, 在 660 nm 激光光照下, 当照射时间为 2 min 时, 对照组、DBN@PEG 组及 DBN/TFN@PEG 组的荧光强度分别为 (218.7 ± 3.5) au、($2\,157.0\pm 22.5$) au 和 ($6\,510.0\pm 72.5$) au; 当照射时间为 5 min 时, 对照组、DBN@PEG 组及 DBN/TFN@PEG 组的荧光强度分别为 (275.3 ± 5.5) au、($5\,312.0\pm 59.4$) au 和 ($15\,896.7\pm 177.9$) au (图 2 B); 当照射时间为 15 min 时, 对照组、DBN@PEG 组及 DBN/TFN@PEG 组的荧光强度分别为 (332.3 ± 2.1) au、($7\,901.0\pm 88.2$) au 和 ($23\,253.7\pm 261.0$) au (图 2 C)。统计结果显示 (图 2 D), 在不同照射时间下, DBN@PEG 组和 DBN/TFN@PEG 组纳米粒子较对照组均能在激光照射下产生更高水平的荧光强度及 ROS 水平 ($P<0.01$), 具备 PDT 性能, 且 DBN/TFN@PEG 组较 DBN@PEG 组产生 ROS 能力更强 ($P<0.01$), 在照射时间分别为 2 min、5 min 和 15 min 时, DBN/TFN@PEG 组的荧光强度均为 DBN@PEG 组的 3 倍左右, PDT 性能更优。模拟计算结果 (图 2 E) 显示, 在 S0 到 S1 的激发中, DBN 的激发能为 $2.120\,0\text{ eV}$, 当引入 TFN 以后, DBN/TFN 的激发能为 $2.113\,00\text{ eV}$, 与 DBN 相比降低了 0.007 eV 。核磁滴定结果 (图 2 F) 显示, 随着 TFN 当量的增加, DBN 的核磁氢位置发生了明显的移动, DBN 活泼氢的化学位移值分别向高场移动了 0.02×10^{-6} , 0.03×10^{-6} , 0.01×10^{-6} , 0.01×10^{-6} , 表明 DBN 与 TFN 形成了较强的氢键相互作用。

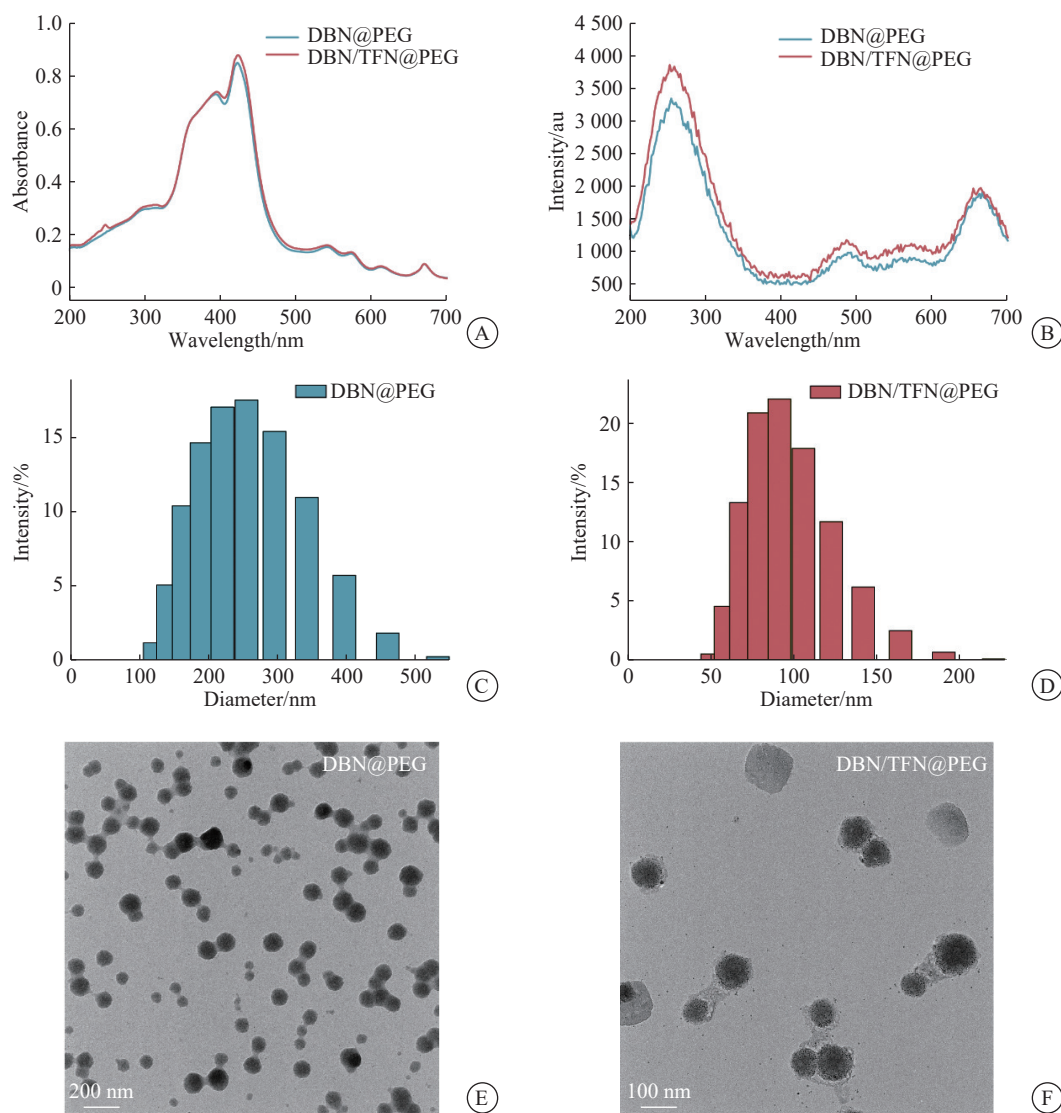


图1 纳米粒子的理化性质检测

Figure 1 Synthesis and characterization of nanoparticles.

A: Ultraviolet-visible absorption spectrum of nanoparticles; B: Fluorescence emission spectrum of nanoparticles; C—D: Dynamic light scattering of nanoparticles; E—F: Transmission electron microscope of nanoparticles.

2.3 激光照射下纳米粒子诱导肿瘤细胞产生的ROS含量检测 结果(图3)显示:对照组、DBN@PEG组和DBN/TFN@PEG组的平均荧光强度值分别为 (12.53 ± 2.05) au、 (39.30 ± 3.35) au和 (80.10 ± 3.10) au。与对照组相比, DBN@PEG组和DBN/TFN@PEG组的平均荧光强度值即ROS含量显著升高($P < 0.01$), DBN/TFN@PEG组平均荧光强度值显著高于DBN@PEG组($P < 0.01$), 表明DBN/TFN@PEG较DBN@PEG在激光照射条件下更能诱导肿瘤细胞产生ROS。

2.4 激光照射下纳米粒子诱导肿瘤细胞死亡能力检测 结果(图4)显示:对照组、DBN@PEG组和DBN/TFN@PEG组平均活细胞比例分别为100%、 $(37.7 \pm 0.7)\%$ 、 $(12.5 \pm 1.8)\%$, 平均死细胞比例分别为0、 $(62.3 \pm 0.7)\%$ 、 $(87.5 \pm 1.8)\%$, DBN/TFN@PEG组平均死细胞比例显著高于DBN@PEG组($P < 0.01$), 提示DBN/TFN@PEG较DBN@PEG在激光照射条件下可能通过诱导更高浓度的ROS进而促进肿瘤细胞死亡。

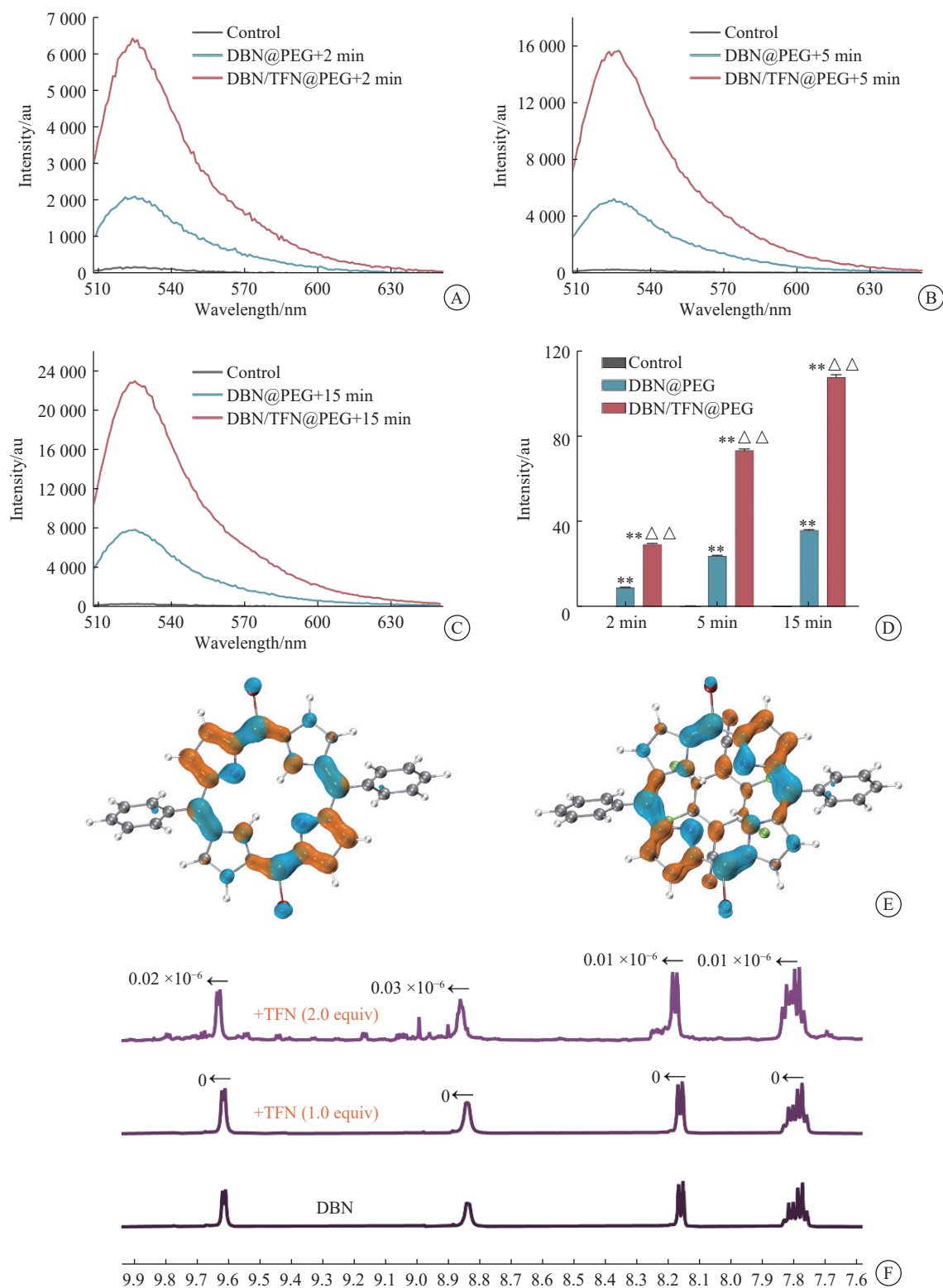


图2 纳米粒子的荧光强度检测及其光敏机制表征

Figure 2 Detection of fluorescence intensity and photosensitive mechanism of nanoparticles

A—C: Fluorescence intensity of nanoparticles after irradiation of 2 min, 5 min and 15 min; D: Relative fluorescence intensity in different groups; E: Distribution of electron-hole in DBN and DBN/TFN groups (blue represents hole, orange represents electron); F: The ^1H NMR spectra of DBN and DBN/TFN. ** $P < 0.01$: comparison with the control group; $\Delta\Delta P < 0.01$: comparison with the group of DBN@PEG.

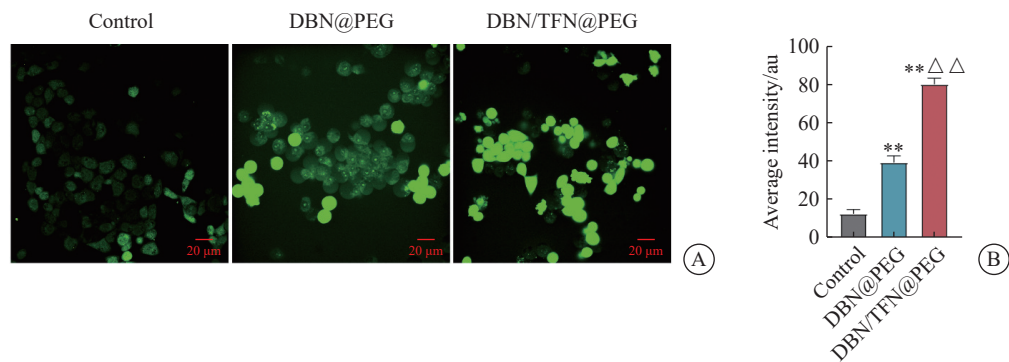


图3 纳米粒子在激光照射下对肿瘤细胞内 ROS 水平的影响

Figure 3 Effects of nanoparticles on ROS production in tumor cells under laser irradiation

A: Intracellular ROS were stained by DCFH-DA and indicated by the green fluorescence intensity ($\times 400$); B: Average fluorescence intensity in different groups. $n=3$, $x \pm s$. ** $P<0.01$: comparison with the control group; $\Delta\Delta P<0.01$: comparison with the group of DBN@PEG.

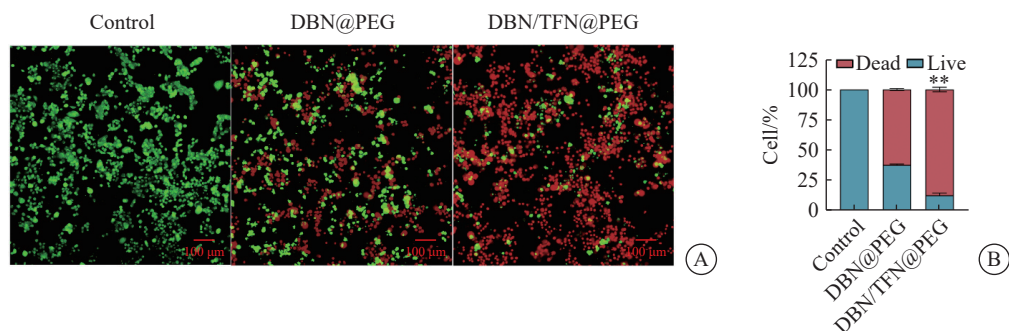


图4 纳米粒子在激光照射下对死/活肿瘤细胞比值的影响

Figure 4 Effects of nanoparticles on the ratio of dead/live tumor cells under laser irradiation

A: Live and dead cells were stained with calcein-AM (green) and PI (red), respectively. 660 nm laser: 100 mW cm^{-2} , 15 min; B: Proportion of dead/live tumor cells in different groups. $n=3$, $x \pm s$. ** $P<0.01$: comparison with the group of DBN@PEG.

3 讨论

随着全球恶性肿瘤发病率的不断上升, 开发创新有效的抗肿瘤治疗手段刻不容缓。PDT 作为一种新型抗肿瘤方式, 因其高靶向性、非侵入性和低耐药率等优点引起了广泛关注, 其疗效已在多种肿瘤类型中得到证实。此外, PDT 与临床常用治疗手段如放疗^[18]、化疗^[19]及免疫治疗^[20]等有协同作用, 联合使用抗肿瘤效果更好。PDT 主要依赖光敏剂在特定波长的光照下与局部氧气发生反应产生高毒性的 ROS, 从而导致肿瘤细胞的死亡。因此, 寻找高效合适的光敏剂对提高 PDT 疗效至关重要。

DBN 是一种有良好光物理性质的传统光敏

剂, 但因平面结构较大, 存在难溶于水和产生 ROS 有限等问题。纳米材料已在临床开展应用^[21]。为了改善 DBN 的光敏性能, 本研究创新性地引入 TFN 制备了一种新型光敏纳米粒子—DBN/TFN@PEG。研究结果也证实, DBN/TFN@PEG 较传统纳米粒子 DBN@PEG 具备更好的光敏能力, 不论激光照射时间长短, 其作为光敏剂产生 ROS 的水平约为 DBN@PEG 的 3 倍, 且在激光照射条件下更能诱导肿瘤细胞产生高浓度 ROS 从而促进细胞死亡, 显示了其作为 PDT 材料稳定且高效的优点。

进一步探究原因发现, 当引入 TFN 以后, 在 S0 到 S1 的激发中, DBN/TFN 的激发能值较 DBN 低, 表明 DBN/TFN 更易受到激光的激发,

从而导致 DBN/TFN@PEG 纳米颗粒表现出更好的 PDT 性能。另一方面,核磁滴定结果证实,随着 TFN 当量的增加,DBN 与 TFN 形成了较强的氢键相互作用,从而增加了 DBN 的水溶性,更有利于在生物体内形成稳定的纳米颗粒。此外,既往研究显示肿瘤血管结构异常,其血管内细胞间隙比正常组织大,合适尺寸的纳米材料可以透过血管在肿瘤组织中富集、滞留,及所谓的高通透性和滞留 (enhanced permeability and retention, EPR) 效应。研究^[22]证明,粒径在 20~200 nm 有利于纳米粒子通过 EPR 效应在肿瘤位置积聚。本研究的 DBN/TFN@PEG 有非常合适的粒径 (107.8 nm),相较于传统的 DBN@PEG 更有利于通过 EPR 效应提高 PDT 疗效。

综上所述,本研究制备了一种新型光敏纳米材料,该材料粒径大小合适,分布均匀,作为光敏剂具备更强的诱导肿瘤细胞产生 ROS 的能力。后续研究人员将在多种类型的肿瘤细胞及体内研究中验证 DBN/TFN@PEG 应用于 PDT 的优势,以期为提高肿瘤 PDT 疗效提供了理论基础和新的方向。

伦理声明 无。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献 郭梦舟:设计研究、实施研究、统计分析、解释数据及文章撰写;刘欢:纳米颗粒制备及检测、实施研究、采集数据;余一祎、李彤:设计研究、提供研究经费、技术指导等工作支持。

参考文献

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] PORPORATO P E, FILIGHEDDU N, PEDRO J M B S, et al. Mitochondrial metabolism and cancer[J]. *Cell Res*, 2018, 28(3): 265-280.
- [3] AN J, TANG S L, HONG G B, et al. An unexpected strategy to alleviate hypoxia limitation of photodynamic therapy by biotinylation of photosensitizers[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2225.
- [4] TAN P, CAI H, WEI Q, et al. Enhanced chemophotodynamic therapy of an enzyme-responsive prodrug in bladder cancer patient-derived xenograft models[J]. *Biomaterials*, 2021, 277: 121061.
- [5] ZHU X D, ZHENG W X, WANG X Z, et al. Enhanced photodynamic therapy synergizing with inhibition of tumor neutrophil ferroptosis boosts anti-PD-1 therapy of gastric cancer[J]. *Adv Sci*, 2024, 11(12): e2307870.
- [6] HUANG J X, ZHUANG C, CHEN J, et al. Targeted drug/gene/photodynamic therapy via a stimuli-responsive dendritic-polymer-based nanococktail for treatment of EGFR-TKI-resistant non-small-cell lung cancer[J]. *Adv Mater*, 2022, 34(27): e2201516.
- [7] HU K, XIE L, ZHANG Y D, et al. Marriage of black phosphorus and Cu²⁺ as effective photothermal agents for PET-guided combination cancer therapy[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2778.
- [8] ZHANG K, YU Z F, MENG X D, et al. A bacteriochlorin-based metal-organic framework nanosheet superoxide radical generator for photoacoustic imaging-guided highly efficient photodynamic therapy[J]. *Adv Sci*, 2019, 6(14): 1900530.
- [9] MUANGSOPA P, CHANSAENPAK K, KAMPAENG-SRI S, et al. Hybrid cyanine/methotrexate nanoparticles for synergistic PDT/chemotherapy of breast cancer[J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2023, 6(2): 603-614.
- [10] HAK A, ALI M S, SANKARANARAYANAN S A, et al. Chlorin E6: a promising photosensitizer in photo-based cancer nanomedicine[J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2023, 6(2): 349-364.
- [11] CASTRO K A D F, RAMOS L, MESQUITA M, et al. Comparison of the photodynamic action of porphyrin, chlorin, and isobacteriochlorin derivatives toward a melanotic cell line[J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2021, 4(6): 4925-4935.
- [12] LI J, LI J H, PU Y J, et al. PDT-enhanced ferroptosis by a polymer nanoparticle with pH-activated singlet oxygen generation and superb biocompatibility for cancer therapy[J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22(3): 1167-1176.
- [13] WANG J Q, ZHANG L Y, LI Z. Aggregation-induced emission luminogens with photoresponsive behaviors for biomedical applications[J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(24): e2101169.
- [14] XIAO P H, SHEN Z P, WANG D L, et al. Precise molecular engineering of type I photosensitizers with

- near-infrared aggregation-induced emission for image-guided photodynamic killing of multidrug-resistant bacteria[J]. *Adv Sci*, 2022, 9(5): e2104079.
- [15] CHEN Y, HE P Y, JANA D, et al. Glutathione-depleting organic metal adjuvants for effective NIR-II photothermal immunotherapy[J]. *Adv Mater*, 2022, 34(21): e2201706.
- [16] OU C J, NA W D, GE W, et al. Biodegradable charge-transfer complexes for glutathione depletion induced ferroptosis and NIR-II photoacoustic imaging guided cancer photothermal therapy[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60(15): 8157-8163.
- [17] CHU M M, QIU B, ZHANG W, et al. Tailoring the energy levels and cavity structures toward organic cocrystal microlasers[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(49): 42740-42746.
- [18] ZHOU D D, GAO Y, YANG Z, et al. Biomimetic upconversion nanoplatform synergizes photodynamic therapy and enhanced radiotherapy against tumor metastasis[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(22): 26431-26441.
- [19] LAN Z, LIU W J, YIN W W, et al. Biomimetic MDSCs membrane coated black phosphorus nanosheets system for photothermal therapy/photodynamic therapy synergized chemotherapy of cancer[J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 174.
- [20] CHEN J, DUAN Z Y, DENG L D, et al. Cell membrane-targeting type I/II photodynamic therapy combination with FSP1 inhibition for ferroptosis-enhanced photodynamic immunotherapy[J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(16): e2304436.
- [21] 秦黎黎,秦瑶,卢天凤.纳米材料作为药物载体在运动性损伤修复中的应用[J].*同济大学学报(医学版)*,2021,42(2):271-277.
- QIN L L,QIN Y,LU T F.Application of nanomaterials as drug carrier in the athletic injury repair[J].*J Tongji Uni (Med Sci)*,2021,42(2):271-277.
- [22] ZHU H J, FANG Y, MIAO Q Q, et al. Regulating near-infrared photodynamic properties of semiconducting polymer nanotheranostics for optimized cancer therapy[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(9): 8998-9009.
- [本文编辑] 王迪

引用本文

郭梦舟, 刘欢, 李彤, 等. 新型光敏纳米粒子的制备及其在肿瘤光动力治疗中的应用[J]. *中国临床医学*, 2024, 31(4): 577-585.

GUO M Z, LIU H, LI T, et al. Preparation and application of novel photosensitive nanoparticles in tumor photodynamic therapy[J]. *Chin J Clin Med*, 2024, 31(4): 577-585.