

# 载血卟啉单甲醚中空金纳米球的光热光动力联合抗肿瘤研究

李娜<sup>1,2</sup>, 游剑<sup>1\*</sup> (1.浙江大学药学院, 杭州 310058; 2.杭州市大江东医院, 杭州 311225)

**摘要:** 目的 设计基于中空金纳米球(hollow gold nanospheres, HAuNS)的新型纳米给药系统(HMME-PEI-HAuNS), 在近红外光照射下研究其同步光热光动力联合抗肿瘤作用。方法 以钴纳米粒为模板制备 HAuNS, 将血卟啉单甲醚(hematoporphyrin monomethylether, HMME)通过枝状聚乙烯亚胺[poly(ethylene imine), PEI]装载到 HAuNS 表面, 形成纳米给药系统(HMME-PEI-HAuNS);采用核磁共振氢谱、红外光谱、紫外光谱分析对 HMME-PEI-HAuNS 进行结构确证。建立荷瘤 SKOV3 小鼠模型,通过荧光活体成像仪考察其体内分布情况。将对肿瘤细胞表面 EphB4 受体具有特异性亲和力的靶向多肽 TNYL 修饰于其表面以增强该纳米体系的靶向性,用核染试剂 Hoechst 染色 SKOV3 细胞,在激光共聚焦显微镜下观察细胞内的荧光强度,用 MTT 比色法进行细胞毒性评价。结果 HAuNS 能对 HMME 进行成功装载,装载率达(63.4±5.2)%。由于肿瘤的高渗透长滞留效应, HMME-PEI-HAuNS 较游离 HMME 和 HMME-PEI 胶束在肿瘤部位有更多的累积量和更长的滞留时间,累计效率约为 1.6%。荧光定量统计显示在 TNYL 多肽的介导下纳米球的靶向性更高,在 808 nm 激光照射下, TNYL-HMME-PEI-HAuNS 发挥光热和光动力协同作用产生强大的肿瘤杀伤作用,在高浓度时,细胞存活率<10%。结论 主动靶向纳米球(TNYL-HMME-PEI-HAuNS)在 808 nm 近红外光照射下具有较强的光热光动力联合抗肿瘤作用。

**关键词:** 中空金纳米球; 血卟啉单甲醚; 近红外光; 光热疗法; 光动力疗法; 肿瘤细胞

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)21-2617-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.21.010

引用本文: 李娜, 游剑. 载血卟啉单甲醚中空金纳米球的光热光动力联合抗肿瘤研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(21): 2617-2624.

## Study on Photothermal and Photodynamic Antitumor Activity of Hollow Gold Nanospheres Coated Hematoporphyrin Monomethyl Ether

LI Na<sup>1,2</sup>, YOU Jian<sup>1\*</sup> (1.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.Hangzhou Dajiangdong Hospital, Hangzhou 311225, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To design a novel nanoparticle delivery system(HMME-PEI-HAuNS) based on hollow gold nanospheres(HAuNS), and to investigate the photothermal and photodynamic antitumor activity under the illumination of near-infrared light. **METHODS** HAuNS were prepared by a redox reaction using cobalt nanoparticles as a template. Hematoporphyrin monomethylether(HMME) was loaded on the surface of HAuNS via poly(ethylene imine)(PEI) as a linker to form a final nanoparticle delivery system(HMME-PEI-HAuNS). The structure of HMME-PEI-HAuNS was confirmed by NMR, IR and UV spectra. A tumor model of SKOV3 in mice was established and the biodistribution of HMME-PEI-HAuNS was investigated by fluorescence *in vivo* imager. Targeting peptide with specific affinity for tumor cell surface EphB4 receptors TNYL was further modified to enhance the tumor-targeting accumulation of the nanosystem. SKOV3 cells were stained with Hoechst, and the fluorescence intensity in the cells was observed using a laser confocal microscope. Cytotoxicity was evaluated by MTT colorimetry. **RESULTS** The HMME was successfully loaded in HAuNS with a rate of (63.4±5.2)%. Due to the enhanced permeability and retention effect of tumor, HMME-PEI-HAuNS had more accumulation and longer retention time in the tumor site than free HMME and HMME-PEI micelles, and the cumulative efficiency was about 1.6%. It was found that the targeting of nanosphere was significantly higher under the mediation of TNYL polypeptides. Under 808 nm laser irradiation, TNYL-HMME-PEI-HAuNS played a synergistic effect of photothermal and photodynamic therapy, inducing a powerful tumor cell killing, and the cell survival rate was less than 10% at high concentrations. **CONCLUSION** Active targeting nanosphere(TNYL-HMME-PEI-HAuNS) have strong photothermal and photodynamic antitumor effect under 808 nm NIR irradiation.

**KEYWORDS:** hollow gold nanospheres; hematoporphyrin monomethyl ether; near-infrared light; photothermal therapy; photodynamic therapy; tumor cells

光热疗法是指具有较高光热转换效率的材料,在特定波长激光照射下将光能转化为局部过

高热能,破坏肿瘤细胞功能的治疗方法<sup>[1]</sup>。光动力疗法是在特定波长光照射下光敏剂将激发态的光

作者简介: 李娜, 女, 药师 Tel: (0571)82153097 E-mail: 383639063@qq.com \*通信作者: 游剑, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0571)88981651 E-mail: youjiandoc@zju.edu.cn

能传递给周围的氧分子,产生的活性氧通过氧化作用破坏细胞中的生物大分子或细胞膜,造成肿瘤细胞损伤或死亡<sup>[2-3]</sup>的治疗方法。

血卟啉单甲醚(hematoporphyrin monomethylether, HMME)作为一种成熟的光敏剂,其单态氧产量高,已被批准用于临床,但其激发波长较短,皮肤组织穿透能力较差,主要用于肺癌、膀胱癌等肿瘤的诊断以及鲜红斑痣、脑胶质瘤和皮肤疾病的治疗,限制了其在深层部位肿瘤治疗上的应用<sup>[4-5]</sup>。中空金纳米球(hollow gold nanospheres, HAuNS)具有较强的局部表面等离子共振效应,对光有较强的吸收、散射和致热能力,且其共振波长、理化性质可通过调节 HAuNS 的形状和粒径控制,作为性质可控的纳米载体被开发用于肿瘤的光热治疗<sup>[6-7]</sup>。但单一的光热疗法可能由于热量分布不均难以完全清除肿瘤,单一的光动力疗法由于光敏剂性质的影响和对组织内含氧量的要求限制了其抗肿瘤效果。为了弥补单一治疗方法的缺陷,笔者设计了光热光动力联合治疗方案。光的组织穿透能力与波长密切相关,在光动力治疗中,由于光敏剂的激发波长较短,治疗效果较差,故笔者利用 HAuNS 的共振散射特性,采用同一近红外激发光源照射载血卟啉单甲醚金纳米球,利用其共振散射短波激发 HMME,实现光热疗法与光动力疗法治联合作用,在增加组织穿透能力的同时达到增强肿瘤杀伤效果的目的。本实验还将一种对肿瘤细胞表面 EphB4 受体具有特异性亲和力的靶向多肽 TNYL 修饰于纳米球表面,进一步增强该纳米体系的靶向性<sup>[8]</sup>,为新型的肿瘤联合治疗方法开拓了新的思路。

## 1 仪器与试剂

Nono-ZS90 型表面电位粒径仪(英国 Malvern Zetasizer); JY92-2D 型超声波细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); Evolution 300 型紫外可见分光光度计、FI-IR-4100 型傅里叶红外分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific); F2500 型荧光分光光度计(日本 Hitachi); JEM-1230 透射电子显微镜(日本 JEOL); A1R 激光共聚焦显微镜(日本 Nikon); Diomed 15 plus 激光治疗仪(英国迪马); Maestro EX 小动物活体成像仪(美国 Maestro); MK3 酶联检测仪(美国 Thermal)。

HMME(上海佰世凯化学科技有限公司,批号: H124003); 氯化钴( $\text{CoCl}_2$ , 批号: V900021)、硼氢化钠( $\text{NaBH}_4$ , 批号: 452882)、枝状聚乙烯亚胺

[poly(ethylene imine), PEI, 批号: 408727]、二异丙基乙胺(*N,N*-diisopropylethy lamine, DIPEA, 批号: 550043)、氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ , 批号: Sigma-379948)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrchloride, EDC, 批号: 77670]、*N*-琥珀酰亚胺基 -*S*-乙酰硫基乙酸酯 (*N*-succinimidyl-*S*-acetylthioglycolate, SATA, 批号: 26102)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS, 批号: 53394)、四甲基氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, 批号: M2128)、细胞核染色试剂 Hoechst 33342(批号: 14533)和 Trauts 试剂(批号: 16256)均购于美国 Sigma-Aldrich; 胰蛋白酶细胞消化液(批号: GNM-25260)、RPMI-1640 培养液(批号: GNM-31800-T-S)购于杭州吉诺生物医药技术有限公司; 特级胎牛血清(以色列 Bioind, 批号: 04-002-1B); TNYL 多肽(上海强耀生物科技有限公司)。

人卵巢癌(SKOV3)细胞购于中国科学院上海细胞库; SPF 级裸鼠, 6~8 周龄, (20.0±2.0)g, 购于上海斯莱克实验动物责任有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(沪)2017-0005。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养及肿瘤小鼠模型的建立

将 SKOV3 细胞在 RPMI-1640 培养液中培养备用(培养液中含有 10%胎牛血清, 青霉素  $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 链霉素  $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。孵育温度  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 待细胞长满后用胰蛋白酶(含有 EDTA)进行传代。取处于对数生长期的 SKOV3 细胞, 用胰蛋白酶消化后制备单细胞悬液, 用计数板计数后按  $5\times 10^6 \cdot (100 \mu\text{L})^{-1}$  每只皮下注射于裸鼠左右后肢腋下, 得到荷瘤 SKOV3 小鼠模型。

### 2.2 纳米给药系统(HMME-PEI-HAuNS)的构建

以钴纳米粒为模板,采用氧化还原法在脱氧环境中制备 HAuNS。将 2.8 mL 柠檬酸钠( $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 1.0 mL 氯化钴( $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 4.0 mL 硼氢化钠( $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )在氩气保护下快速加入反应瓶中, 高速搅拌, 当反应液由浅紫色变为深棕色后加入氯金酸, 继续反应 1 h 后缓慢通入氧气, 使钴纳米粒重新被氧化为  $\text{Co}^{2+}$ , 沉淀在其表面的单质金则形成了 HAuNS。HMME-PEI-HAuNS 的步骤合成见图 1。

### 2.3 HMME-PEI-HAuNS 的理化性质表征

在透射电镜下观察 HMME-PEI-HAuNS 的形态结构; 用粒径电位分析仪测定  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  下的粒径大小; 用紫外分光光度计扫描 400~900 nm 处的紫外

吸收光谱;由于产物 H AuNS 的紫外吸收峰会干扰对 HMME 吸光度的测量,本实验用间接法计算包封率,计算公式(1)如下:

$$EE(\%)=(1-OD_{\text{未反应}}/OD_{\text{母液}})\times 100\% \quad (1)$$

其中,  $EE$  为药物包封率(%);  $OD_{\text{未反应}}$  为上清液在 498 nm 处的吸光度;  $OD_{\text{母液}}$  为和上清液稀释相同倍数的标准品溶液在 498 nm 处的吸光度。

测定核磁共振图谱和红外光谱进行结构确证。

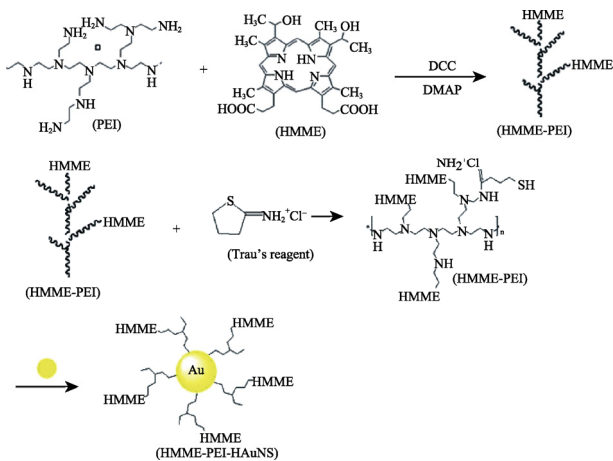


图 1 HMME-PEI-HAuNS 的合成步骤  
Fig. 1 Synthesis step of HMME-PEI-HAuNS

#### 2.4 HMME-PEI-HAuNS 的稳定性研究

平行取 3 份等量新制 HMME-PEI-HAuNS 溶液,分别在 0, 3, 6, 9, 12 d 考察其粒径稳定性。

取等量 HMME-PEI-HAuNS, 分别加入至 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液和血清溶液中, 每个样品平行 3 份, 分别在 0, 3, 6, 9, 12 h 取适量样品, 离心后测其 498 nm 处的吸光度。血清样品加甲醇后离心, 取上清液测其 498 nm 处的吸光度。以各组 0 h 时的吸光度为零点, 计算累积释放度, 考察药物 HMME 在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液和血清溶液中的稳定性。

#### 2.5 HMME-PEI-HAuNS 的药物释放分析和小鼠体内分布情况

取 HMME-PEI-HAuNS(HMME : H AuNS=1 : 2)溶液 400  $\mu\text{L}$ , 平均分为 4 份, 2 份分散于 1 mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中, 另取 2 份分散于 1 mL pH 5.8 的缓冲液中。对照组置于磁力搅拌器上避光搅拌, 分别于 3, 6, 9, 12 h 后离心, 取上清液测定 498 nm 处吸光度; 实验组置于磁力搅拌器上激光照射(2 W· $\text{cm}^{-2}$ , 5 min)后避光搅拌, 3 h 后离心, 取上清液测定 498 nm 处吸光度, 再次激光照射, 以此类推; 以各组 0 h 时的吸光度为零点, 计算累

积释放度, 考察药物 HMME 在不同条件下的药物释放情况。

以荷瘤 SKOV3 小鼠为模型, 待肿瘤体积长到约 150  $\text{mm}^3$  时, 将裸鼠随机分组, 每组分别尾静脉注射等量游离 HMME、HMME-PEI 或 HMME-PEI-HAuNS 的水溶液 200  $\mu\text{L}$ 。在给药后 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 h 用小动物活体成像仪通过 HMME 荧光(488 nm)观察 HMME-PEI-HAuNS 组药物在小鼠体内的经时分布情况。48 h 后, 将 3 组裸鼠解剖, 取各个器官(心、肝、脾、肺、肾)、血液及 5% 给药剂量的药物溶液, 再次采集 HMME 的荧光图像, 并用荧光活体成像仪计算各个器官的荧光信号值; 用各器官的荧光信号值除以器官质量, 以 5% 给药剂量的荧光值作为对照, 考察 HMME-PEI-HAuNS 药物在小鼠体内的分布情况。

#### 2.6 HMME-PEI-HAuNS 的主动靶向修饰

通过 PEG-SH 为连接物将 TNYL 多肽修饰于 H AuNS 表面: 将  $\text{NH}_2$ -PEG5000-COOH、SATA、DIPEA 加入无水二氯甲烷中搅拌过夜后, 将粗产物过凝胶柱纯化, 得到 SATA-PEG5000-COOH, 将其羧基采用 EDC 和 NHS 耦合得到 SATA-PEG5000-CONHS, 随后将其与 TNYL-RAW 多肽在二氯甲烷中反应 24 h 后过凝胶柱进行再次纯化, 加入  $\text{NH}_2\text{OH}$  得到 TNYL-PEG5000-SH。按照质量比 TNYL-PEG5000-SH : H AuNS 为 1 : 10 的比例加入 HMME-PEI-HAuNS 的水溶液中, 磁力搅拌 24 h 后得到 TNYL-HMME-PEI-HAuNS。

#### 2.7 TNYL-HMME-PEI-HAuNS 的结构确证

取 1 mL TNYL-HMME-PEI-HAuNS(HAuNS 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 离心后将沉淀于 0.6 mL 氘代水中分散均匀, 以等量 TNYL 多肽为对照, 采用核磁共振氢谱图验证 TNYL 多肽在 H AuNS 表面的成功修饰。

#### 2.8 TNYL-HMME-PEI-HAuNS 的细胞摄取研究和体外抗肿瘤效果评价

向 SKOV3 细胞培养液中加入游离 HMME、HMME-PEI-HAuNS、TNYL-HMME-PEI-HAuNS, 6 h 后用核染试剂(Hoechst 33324)染色, 在共聚焦显微镜下观察细胞内 HMME 的荧光强度。

采用 MTT 比色法评价 HMME 和 H AuNS 的光热联合光动力细胞杀伤作用: 将 SKOV3 细胞按每孔 8 000 个接种于 96 孔细胞培养板培养, 待其贴壁后, 对照组换新鲜培养液 200  $\mu\text{L}$ , 实验组分别加入不同浓度的游离 HMME、H AuNS、HMME-PEI-HAuNS 和 TNYL-HMME-PEI-HAuNS(HMME

0.5~50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 孵育 4 h 后 808 nm 激光照射 15 min( $1\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), 48 h 后加入 MTT 试剂使生成甲瓩结晶, 弃去上清液, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解甲瓩, 用酶标仪测定 574 nm 处的吸光度, 按公式(2)计算细胞存活率。

$$V_{48\text{ h}}(\%)=A_{\text{treated}}/A_{\text{control}}\times 100\% \quad (2)$$

其中,  $V_{48\text{ h}}$  为 48 h 细胞存活率(%);  $A_{\text{treated}}$  为实验组在 574 nm 的吸光度;  $A_{\text{control}}$  为对照组在 574 nm 的吸光度。

用 Graphpad Prism 软件对实验数据进行统计处理, 计算药物的  $IC_{50}$  值。

### 3 结果

#### 3.1 HMME-PEI-HAuNS 的形态结构观察和粒径测定

在透射电子显微镜下观察, HAuNS 呈中空结构, 粒径均匀, 在 50 nm 左右; HMME-PEI 由于其结构呈现两亲性质, 可自发聚集, 用磷钨酸负染后可见粒径约为 20 nm 的均匀胶束; 而 HAuNS 在连接了 HMME-PEI 胶束后, 由于表面的高分子及药物层, 所得到的 HMME-PEI-HAuNS 具有“膜壳结构”, 结果见图 2。

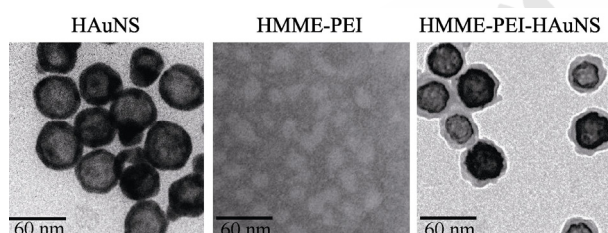


图 2 HAuNS、HMME-PEI、HMME-PEI-HAuNS 的透射电镜图

Fig. 2 Representative transmission electron microscope images of HAuNS, HMME-PEI, HMME-PEI-HAuNS

采用动态光散射法测定粒径和电位, 结果见表 1。HMME-PEI-HAuNS 的粒径分布为均匀的单峰, 证明纳米粒的粒径较为均匀, 分散性良好, 与透射电镜观察到的结果一致。经间接法测定紫外吸光度后发现, HAuNS 对光敏剂 HMME 的装载效率良好。结果见图 3。

表 1 HAuNS、HMME-PEI、HMME-PEI-HAuNS 的粒径、电位及包封率( $n=3$ )

对象	粒径/nm	PDI	电位/mV	包封率/%
HAuNS	50.6 $\pm$ 3.2	0.04 $\pm$ 0.01	-22.40 $\pm$ 0.61	-
HMME-PEI	25.3 $\pm$ 5.1	0.14 $\pm$ 0.03	20.58 $\pm$ 0.71	-
HMME-PEI-HAuNS	96.7 $\pm$ 9.8	0.23 $\pm$ 0.06	-4.58 $\pm$ 0.78	63.4 $\pm$ 5.2

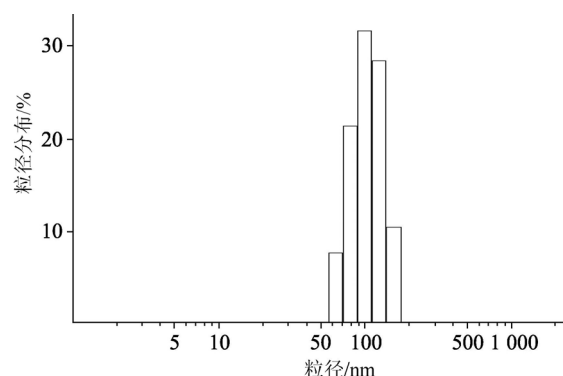


图 3 HMME-PEI-HAuNS 的粒径分布图

Fig. 3 Image of particle size distribution of HMME-PEI-HAuNS

#### 3.2 HMME-PEI-HAuNS 的结构确证

HAuNS 无任何核磁共振特征峰出现; PEI 在  $\delta 2.5$  处呈现氨基特征吸收峰; 游离 HMME 在  $\delta 12.2$  处有明显的羧基特征吸收峰; 当游离 HMME 分子中的羧基与部分 PEI 分子中的伯胺基发生脱水缩合反应后, 所得到的 HMME-PEI 在  $\delta 12.2$  处的羧基吸收峰消失, 且在  $\delta 2.5$  处的氨基吸收峰也发生形态上的改变; 而在 HMME-PEI-HAuNS 的核磁共振氢谱图中, 可看到  $\delta 3.5$  处 HMME 结构中未参与反应的羟基氢的吸收峰、 $\delta 1.0$  处亚甲基的吸收峰、 $\delta 2.6$  处 PEI 中剩余氨基的吸收峰以及  $\delta 2.1$  处巯基的吸收峰。由此可说明光敏剂 HMME 可以通过 PEI 作为中介成功被化学嫁接于 HAuNS 上。结果见图 4。

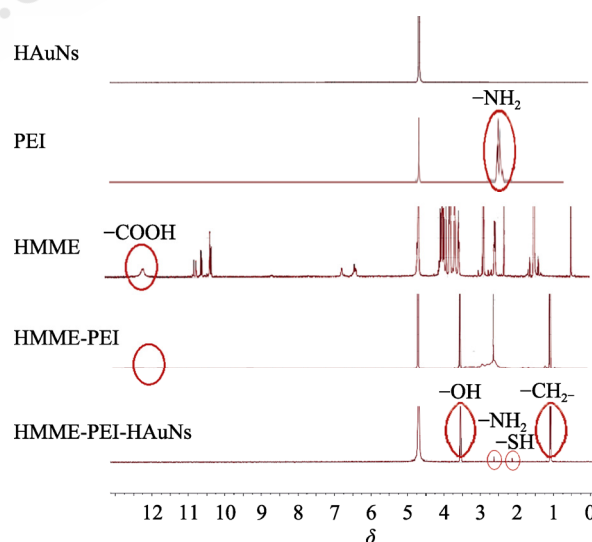


图 4 HAuNS、PEI、HMME、HMME-PEI、HMME-PEI-HAuNS 的核磁共振氢谱图

Fig. 4 Representative  $^1\text{H}$ -NMR spectra of HAuNS, PEI, HMME, HMME-PEI, HMME-PEI-HAuNS



HAuNS 无明显特征吸收峰; 光敏剂 HMME 在  $3\ 300\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 700\ \text{cm}^{-1}$  附近有羧基的特征吸收峰; HMME-PEI 在  $2\ 800\ \text{cm}^{-1}$  附近有氨基的吸收峰; HMME-PEI-HAuNS 峰形有明显改变, 在  $1\ 700\ \text{cm}^{-1}$  附近出现了与 HMME、PEI 结合后的酰胺基吸收峰, 且 HMME 中的羧基峰消失, 整个图谱与游离 HMME 相似。该结果进一步证明 HAuNS 对 HMME 的成功装载。红外扫描图谱见图 5。

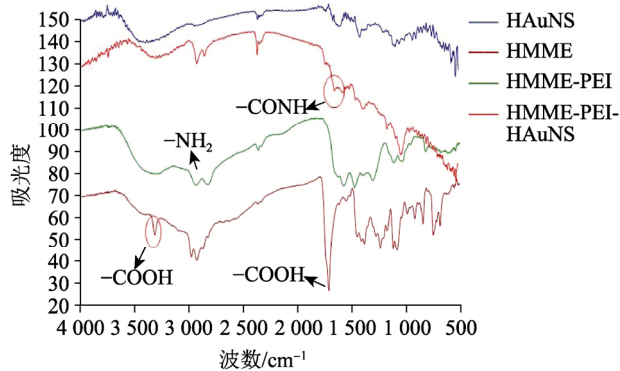


图 5 HAuNS、游离 HMME、HMME-PEI、HMME-PEI-HAuNS 的红外扫描图谱  
Fig. 5 Representative IR spectra of HAuNS, HMME, HMME-PEI, HMME-PEI-HAuNS

HAuNS 在  $808\ \text{nm}$  处有显著的紫外吸收峰; 游离光敏剂 HMME 在  $402, 500, 528, 580, 620\ \text{nm}$  处有特征吸收峰; 经 PEI 结合后的 HMME 与游离 HMME 相比, 吸收峰无明显变化; 而 HMME-PEI-HAuNS 既在  $808\ \text{nm}$  处有 HAuNS 的吸收峰, 同时也出现了 HMME 的特征吸收峰。该结果也说明了本研究实现了 HAuNS 对光敏剂 HMME 的成功装载。紫外吸收光谱图见图 6。

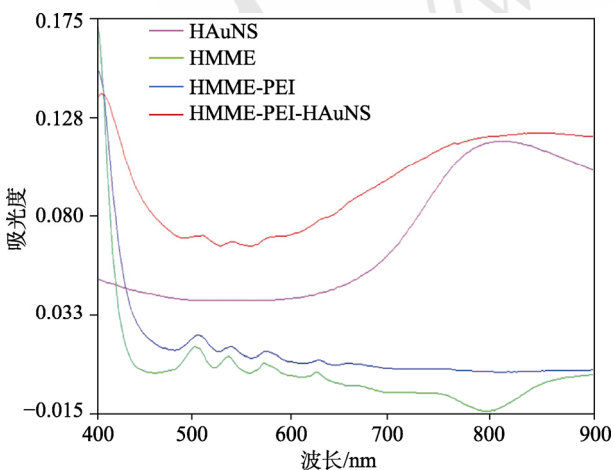


图 6 HAuNS、游离 HMME、HMME-PEI、HMME-PEI-HAuNS 的紫外吸收光谱图  
Fig. 6 Representative UV spectra of HAuNS, HMME, HMME-PEI, HMME-PEI-HAuNS

### 3.3 HMME-PEI-HAuNS 的稳定性研究

HMME-PEI-HAuNS 的粒径在 12 d 内的极差为  $34\ \text{nm}$ , 粒径大小呈缓慢上升趋势, 但均  $<150\ \text{nm}$ 。结果见图 7。

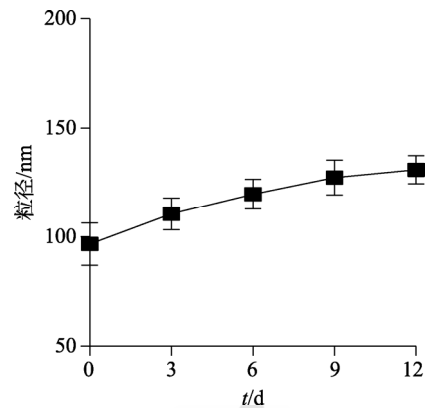


图 7 HMME-PEI-HAuNS 在 12 d 内的粒径稳定性 ( $n=3$ )  
Fig. 7 Size stability of HMME-PEI-HAuNS in 12 d ( $n=3$ )

HMME-PEI-HAuNS 在磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4) 和血清中 12 h 内的累积释放率均  $<15\%$ , 可进一步推测当药物进入体内环境后能保持较好的稳定性, 有利于后续发挥其应有的功效。结果见图 8。

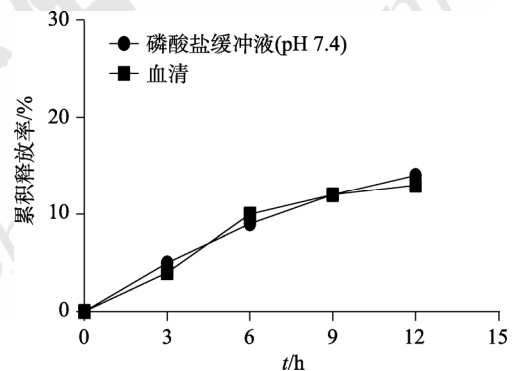


图 8 HMME-PEI-HAuNS 在磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 和血清中 12 h 内的累积释放率  
Fig. 8 Cumulative release of HMME-PEI-HAuNS within 12 h in phosphate buffer (pH 7.4) and serum

### 3.4 HMME-PEI-HAuNS 在激光照射下的药物释放分析

在模拟生理环境 (pH 7.4) 的磷酸盐缓冲溶液中, 对照组和激光照射组的 HMME 释放率从 6 h 开始出现了明显差距, 激光照射组的累积释放率大约是对照组的 2 倍。说明激光照射对 HMME-PEI-HAuNS 中 HMME 的释放有促进作用。在模拟肿瘤部位弱酸性环境 (pH 5.8) 的磷酸盐缓冲溶液中, 与对照组相比, 激光照射组的 HMME 的释放率约增加了 1 倍, 同样说明激光照射对 HMME 药物的释放有促进作用。结果见图 9。

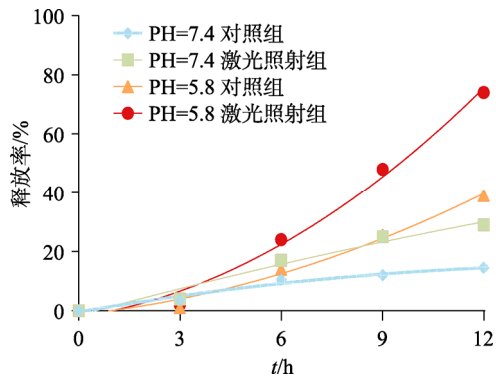


图 9 不同 pH 条件下 HMME-PEI-HAuNS 在近红外激光照射后的药物释放曲线

Fig. 9 Drug release curve of HMME-PEI-HAuNS after NIR laser irradiation under different pH conditions

### 3.5 HMME-PEI-HAuNS 在小鼠体内分布情况

在注射 HMME-PEI-HAuNS 1 h 后双侧肿瘤部位已经有药物到达, 并且随着时间延长药物累积量增加, 在 6 h 时药物累积最多, 且直到 48 h 后, 肿瘤部位仍然有药物发挥作用, 可见药物能在肿瘤部位滞留较长时间。图 11 可见游离 HMME 对肿瘤部位几乎无特异性累积; 而 HMME-PEI 由于其胶束结构, 有小部分可通过高渗透长滞留效应到达肿瘤部位; HMME-PEI-HAuNS 在 HAuNS 的介导下可更多地累积至肿瘤部位, 减少其在其他约有 1.6% 的 HMME-PEI-HAuNS 经高渗透长滞留脏器的非特异性累积; 荧光半定量结果显示, 大效应

到达肿瘤组织。结果见图 10。

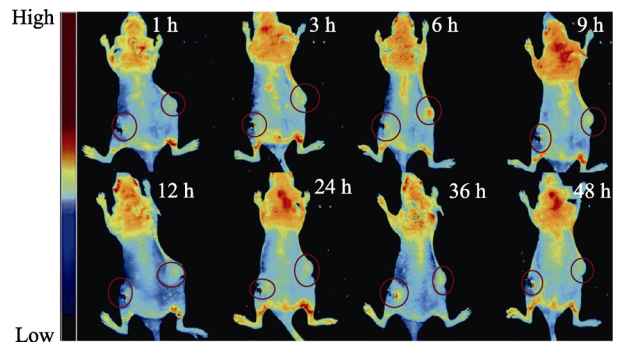


图 10 HMME-PEI-HAuNS 经尾静脉注射后在荷瘤 SKOV3 小鼠体内的经时分布  
红色圆圈指示肿瘤部位。

Fig. 10 *In vivo* distribution of intravenously injected HMME-PEI-HAuNS in SKOV3 tumor-bearing mice at different time points

Red circle indicated the tumor site.

HMME-PEI-HAuNS 尾静脉注射给药后, 在胃、小肠、骨中分布较多, 主要是由于裸鼠食物中的叶绿素和自身血液产生了较强的非特异性自发荧光, 不可避免地导致了干扰的出现。结果见图 11。

### 3.6 TNYL-HMME-PEI-HAuNS 的结构确证

在 TNYL-HMME-PEI-HAuNS 图谱中出现了与游离多肽类似的特征峰, 并且在约  $\delta 3.6$  处出现了 PEG 结构中氨基的特征峰, 故可证明 TNYL 多肽被成功连接于 HAuNS 表面。结果见图 12。

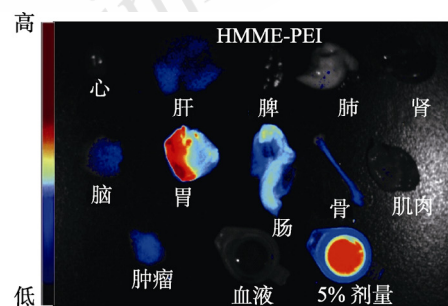
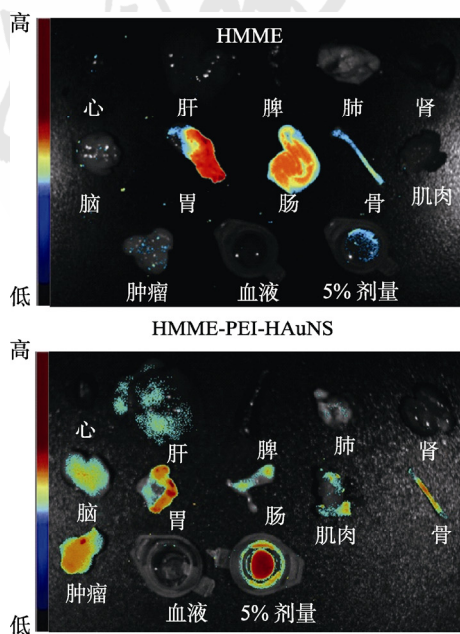
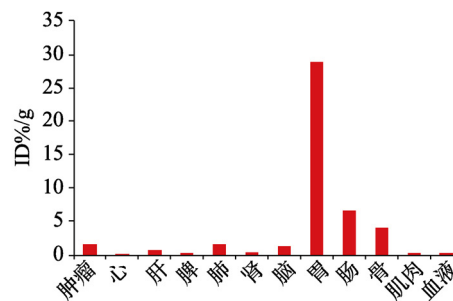


图 11 游离 HMME、HMME-PEI、HMME-PEI-HAuNS 经尾静脉注射后在荷瘤 SKOV3 小鼠体内的荧光分布图像及 HMME-PEI-HAuNS 在各器官中的荧光半定量结果

Fig. 11 *In vivo* fluorescence distribution of intravenously injected free HMME, HMME-PEI, HMME-PEI-HAuNS in SKOV3 tumor-bearing mice and the accumulation of HMME-PEI-HAuNS in various organs read by the imaging system



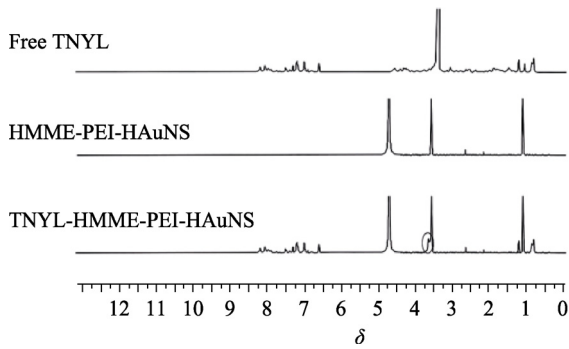


图 12 游离 TNYL 多肽、HMME-PEI-HAuNS、TNYL-HMME-PEI-HAuNS 的核磁共振氢谱图

Fig. 12 Representative  $^1\text{H-NMR}$  spectra of free TNYL, HMME-PEI-HAuNS and TNYL-HMME-PEI-HAuNS

### 3.7 TNYL-HMME-PEI-HAuNS 的细胞摄取研究和体外抗肿瘤效果评价

本研究采用 EphB4 受体表达阳性的 SKOV3 细胞系来考察由 TNYL 多肽所介导的特异性细胞摄取。游离 HMME 在经历 6 h 的孵育后，在细胞内荧光依然十分微弱，表明游离药物很难通过扩散进入细胞内，结果见图 13；在与 HAuNS 共价结合后所得的 HMME-PEI-HAuNS 可在 6 h 内大量被细胞所摄取；而经靶向多肽 TNYL 修饰后，细胞内 HMME 荧光强度最高，这是由于其对 SKOV3 表面高表达的 EphB4 受体具有特异性亲和力，可更多地进入细胞内。对荧光图片进行定量的数据也进一步证明了这一结果，结果见图 14。

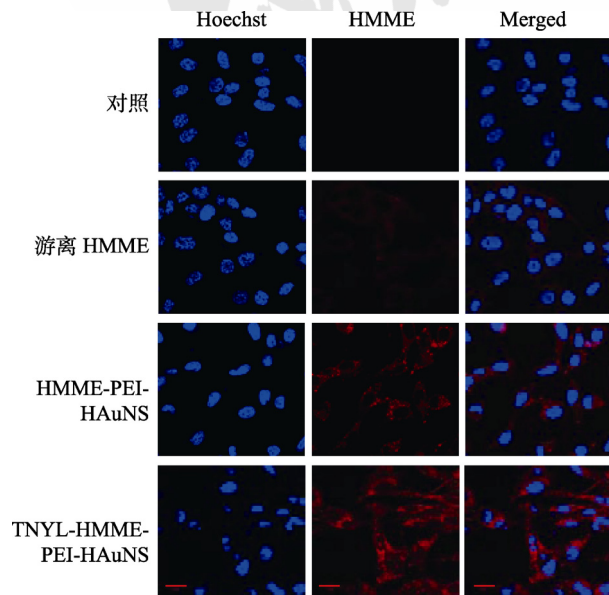


图 13 游离 HMME、HMME-PEI-HAuNS、TNYL-HMME-PEI-HAuNS 的肿瘤细胞摄取图片

Fig. 13 Uptake images of free HMME, HMME-PEI-HAuNS, TNYL-HMME-PEI-HAuNS in tumor cell

由于 HMME 的光动力效果需在 500 nm 左右激光照射下实现，故在 808 nm 近红外激光照射时，游离 HMME 对细胞的杀伤力十分有限；HAuNS 由于其光热效果，在高浓度时产生了一定细胞毒性；在 808 nm 激光照射下，HMME-PEI-HAuNS 中的 HAuNS 吸收光能，在将其转化为热能的同时产生的短波长可进一步激发 HMME 的光动力作用，产生了明显的抗肿瘤效果，其  $IC_{50}$  为  $12.45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；在 TNYL 多肽的介导下，由于更多的纳米球被细胞所摄取，故产生了最强的肿瘤细胞杀伤力，其  $IC_{50}$  为  $6.45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，在高浓度时，细胞存活率  $<10\%$ 。以上结果说明，在 TNYL 多肽介导的主动靶向作用下，近红外激光可有效激发 HAuNS 以及 HMME 的联合光热光动力效应，对肿瘤细胞造成致死打击。结果见图 15。

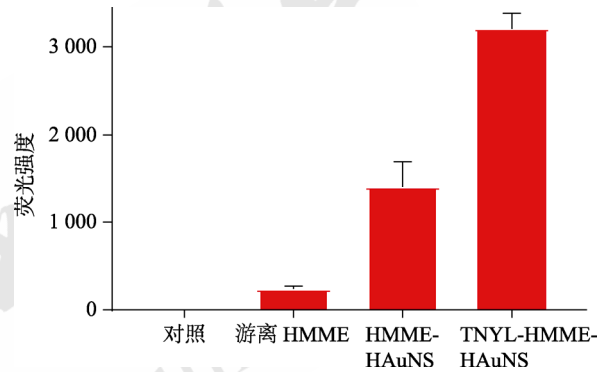


图 14 游离 HMME、HMME-PEI-HAuNS、TNYL-HMME-PEI-HAuNS 的细胞摄取荧光定量结果 ( $n=3$ )

Fig. 14 Fluorescence quantitative comparison of free HMME, HMME-PEI-HAuNS, TNYL-HMME-PEI-HAuNS in tumor cell ( $n=3$ )

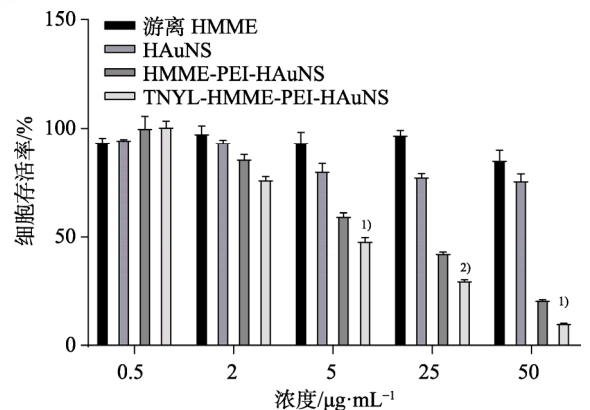


图 15 游离 HMME、HAuNS、HMME-PEI-HAuNS 以及 TNYL-HMME-PEI-HAuNS 的细胞毒性 (HAuNS 浓度为 HMME 浓度的 2 倍,  $n=3$ )

与 HMME-PEI-HAuNS 相比,  $^1)P<0.01$ ,  $^2)P<0.001$ 。

Fig. 15 Cytotoxicity of free HMME, HAuNS, HMME-PEI-HAuNS and TNYL-HMME-PEI-HAuNS (The concentration of HAuNS was twice that of HMME,  $n=3$ )

Compared with HMME-PEI-HAuNS,  $^1)P<0.01$ ,  $^2)P<0.001$ .

#### 4 讨论

癌症一直是威胁人类生命的重大疾病之一，目前临床上的常规治疗方法如手术切除、化疗和放疗等均不能达到理想的成效。而光响应疗法因其微创、可控、高效、低不良反应的优点，近年来被广泛关注。笔者前期研究中发现，粒径 50 nm 的 H AuNS 由于表面等离子效应在 530 nm 处有较强的共振散射峰，该散射波长与 HMME 的激发波长重合，本实验中 HMME-PEI-H AuNS 良好的体外抗肿瘤效果可能由此导致。在 TNYL 多肽的介导下，纳米给药系统能被 SKOV3 细胞特异性摄取，实验结果显示 HMME 在近红外光和肿瘤微酸环境下能被极大地释放出来，导致 TNYL-HMME-PEI-H AuNS 产生了强大的肿瘤细胞杀伤力，同时降低了药物的不良反应，这种光热光动力新型联合模式为肿瘤安全有效治疗提供了新思路。

#### REFERENCES

[1] YU B, LIAN H Y, WANG Y, et al. Research advance of nanomaterials in cancer treatment [J]. Chin J Cell Biol(细胞生

物学杂志), 2015, 37(4): 594-598.

- [2] DONG H, WU R X, LIU J Q, et al. Advances in cancer photodynamic therapy [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2016, 47(4): 377-387.
- [3] SHENG Y J, NESBITT H, CALLAN B, et al. Oxygen generating nanoparticles for improved photodynamic therapy of hypoxic tumours [J]. J Control Release, 2017(264): 333-340.
- [4] 杨智, 熊英, 王雪, 等. 血卟啉单甲醚光动力治疗[J]. 皮肤病与性病, 2014, 36(2): 74-75.
- [5] ZHANG D D, LI W N, MEI W J, et al. Studies on the target of photodynamic therapy with porphyrin derivatives as photosensitizer [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(4): 445-449.
- [6] CHARATI M B, LEE I, HRIBAR K C, et al. Light-sensitive polypeptide hydrogel and nanorod composites [J]. Small, 2010, 6(15): 1608-1611.
- [7] ZHANG Y J, YANG S E, CHENG Y S, et al. The study of the metal nanoparticle light scattering [J]. Acta Energetica Solaris Sin(太阳能学报), 2017, 38(3): 721-725.
- [8] DAI Y Q, ZHANG Q, LIU Q, et al. Progress of Eph in ovarian cancer [J]. J Med Postgraduates(医学研究生学报), 2012, 25(10): 1112-1115.

收稿日期: 2020-01-18

(本文责编: 蔡珊珊)