

文章编号: 1006-3080(2019)02-0285-08

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20180314007

氟化透明质酸光敏剂负载聚多巴胺纳米粒子用于乏氧肿瘤的光动力与光热协同治疗

田 君, 张伟安

(华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237)

摘要:光动力疗法(PDT)是光敏剂通过光激活产生的单线态氧($^1\text{O}_2$)来杀死癌细胞。光动力疗法的3个关键因素主要有:光、光敏剂与组织氧。在PDT治疗过程中,氧气消耗和实体瘤中固有的缺氧微环境可能进一步导致供氧不足,阻碍光动力疗效,而光热疗法(PTT)不受乏氧环境的影响,且具有无创性、低毒性等优点。将全氟化碳(PFCs)和光敏剂(Pba)接枝到透明质酸(HA)链中,然后负载聚多巴胺纳米粒子(PDANPs),设计出了一种新型的靶向自供氧光动力与光热协同治疗体系。由于PDANPs优良的光热转换性能、PFC较高的氧亲和力和HA的肿瘤靶向性,使得该协同疗法的抗肿瘤作用显著提高,细胞毒性实验以及细胞摄取实验证明了其增强的光热与光动力治疗效果。

关键词:自供氧;全氟化碳;聚多巴胺;光动力治疗;光热治疗

中图分类号:O69

文献标志码:A

由于发病率和死亡率的增加,癌症已成为全球范围内死亡的主要原因之一。到目前为止,已经开展了许多用于癌症治疗的技术,例如基因治疗、放射疗法、化学疗法、光动力疗法(PDT)、光热疗法(PTT)和协同疗法^[1-2]。其中,PDT是通过光敏剂(PS)在光激活情况下产生活性氧(ROS)杀死癌细胞的一种治疗方法,在过去40年中已被广泛地应用于许多局部和表面的癌症治疗^[3]。PDT涉及3个主要因素,一个是能够收集光并进行光动力学反应的PS,一个是为PS提供能量的适当光源,以及由激发的PS转移能量产生ROS所需的组织内氧气^[4-5]。

然而,PDT的有效性受到肿瘤供氧不足这一微环境的限制^[6-7]。实体肿瘤通常由于快速增殖的特性和混乱不规则的血管系统导致其需氧量远超过血液氧气供应量,而使部分肿瘤处于缺氧微环境中^[8]。由于肿瘤区低氧气水平,因此乏氧肿瘤区可能被排除在多种治疗方法之外,不可避免地会导致肿瘤复发

和转移^[9]。针对PDT的这一问题,国内外众多学者进行了许多研究。Wang等^[10]报告了一种基于血红蛋白(Hb)氧气载体体系,即通过化学作用将血红蛋白与三嵌段共聚物共轭结合,通过自组装行为得到将第二代光敏剂酞菁锌(ZnPc)封装在中间的胶束。研究者评估了共轭后Hb的氧结合能力和抗氧化活性,从而补偿ROS产生过程中的氧需求量。更重要的是,与无Hb的ZnPc胶束相比,含有Hb的ZnPc胶束体系在HeLa细胞中体外实验中能够产生更多的单线态氧($^1\text{O}_2$)且具有更大的细胞光毒性。Cheng等^[11]利用全氟化碳(PFCs)作为PS和氧气的载体,研究出了新型的氧自给的PDT(Oxy-PDT),近红外吸收波长为808 nm,并且它们与全氟化碳均匀分散在脂质单层中,在表面修饰聚乙二醇(PEG, $M_w=2\ 000$)。这个体系不依赖于乏氧微环境、氧耗或血管损伤,并且体外实验和体内实验显示出比传统PDT更好的治疗功效。此外,PFCs的 $^1\text{O}_2$ 寿命远远长于水中的 $^1\text{O}_2$,从而

收稿日期: 2018-03-21

作者简介: 田 君(1992-),女,安徽人,硕士生,主要从事卟啉光敏剂的研究与应用。E-mail: tianjun0701@163.com

通信联系人: 张伟安, E-mail: wazhang@ecust.edu.cn

引用本文: 田 君,张伟安. 氟化透明质酸光敏剂负载聚多巴胺纳米粒子用于乏氧肿瘤的光动力与光热协同治疗[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2019, 45(2): 285-292.

Citation: TIAN Jun, ZHANG Weian. Polydopamine-Loaded Fluorinated Hyaluronic Acid (HA) Photosensitizer Nanoparticles for Synergetic Photodynamic and Photothermal Therapy of Hypoxic Tumors[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2019, 45(2): 285-292.

导致了持久的光动力效果。Zheng等^[12]报道了一种基于卟啉脂质体的体系,将卟啉接枝到脂质链中,通过组装形成卟啉体的结构,研究发现,在正常氧气含量情况下,该体系可体现协同的光动力与光热效用,而在乏氧情况下,光热可替代光动力起到很好的治疗作用。PTT因其对正常组织的无创性、低毒性以及高效的治疗效果而倍受关注^[13],而且不受乏氧微环境的影响。光热剂在 NIR 区具有强吸光度,能够有效地将光能转化为热能,从而导致肿瘤区域过热(高于 42 °C)并杀死肿瘤细胞。理想的光热剂具有高的光热转换效率和光稳定性且不会对正常组织产生毒副作用等优点^[14]。各种具有优异 PTT 效果的光热材料被广泛探讨,包括无机纳米材料^[15-16]和聚合物纳米粒子^[17-18]。尽管大多数光热剂在肿瘤治疗中显示出很大的应用前景,但诸如光稳定性差、光热转化效率不足以及循环时间短等一些性质阻碍了其在癌症治疗中的进一步应用。聚多巴胺纳米材料由于具有优异的生物相容性和生物降解性,已被作为生物医学应用的优异材料^[19],现今 PDANPs 常被用作 PTT 剂,是由于其独特的强光吸收和高的光热转换效率^[20-22],另外,由于 PDANPs 的能量转移和电子转移性能,它也可以用作荧光猝灭剂^[23]。

本文在以上研究的基础上,结合克服肿瘤乏氧与光热治疗,将光敏剂和 PFCs 接枝到 HA 链中,同时负载聚多巴胺纳米粒子,设计出一种新型的靶向自供氧光动力与光热协同治疗体系。由于氟原子的电负性高,PFCs 具有优异的氧亲和力^[24],因此,与烃基化合物和水相比,PFCs 具有较高的氧溶解度。因此,尽管肿瘤组织中的氧含量低,但 PFCs 可以内化足够的氧气用于光动力治疗消耗,从而获得增强的 PDT 抗肿瘤效果^[25]。由于 PFC 与焦脱镁叶绿酸- α (Pba)皆为强疏水的化合物,不利于长循环,故引入了透明质酸(HA)。HA 是一种带有负电荷的线性天然多糖^[26],由于其良好的生物相容性、可降解性、可修饰性等优点,被广泛用于药物载体,而且 HA 可以与癌细胞表面过表达的特异性受体进行特异性结合,比如透明质酸介导的受体(RAHMM)和 CD44 受体^[27-29]。本文将氟化透明质酸光敏剂 Ac-HA-PFC-Pba 通过金属配位作用包覆在 PDANPs 表面,Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 与 HA 受体特异性结合并通过 HA 受体介导的内吞作用内化,因此 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 里的透明质酸被透明质酸酶(HAase)降解,从而将 Pba 与 PFC 和 PDANPs 分离、PFC 载氧,提高了乏氧

肿瘤区域的氧气含量,有利于更多的 $^1\text{O}_2$ 的产生,从而提高了 PDT 治疗效果。另外,PDANPs 能在激光照射下产生热量,从而进一步杀死癌细胞。因此,通过 PDT 和 PTT 协同作用能使抗肿瘤功效增强。综上所述,本文认为这种新型的自供氧体系可用于乏氧肿瘤的靶向光热、光动力协同治疗。

1 实验部分

1.1 主要试剂

酶切寡聚透明质酸钠(相对分子质量 6 155),购于华熙福瑞达生物医药有限公司;焦脱镁叶绿酸- α (Pba),购于宁波东米生物技术有限公司;多巴胺盐酸盐、乙酸酐(AA)、吡啶、1,3-二环己基碳二亚(DCC)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、甲酰胺和无水二甲基亚砷(DMSO)、无水三氯化铁、PFCs,均购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;透析膜购于上海源叶生物科技有限公司;细胞培养基(DMEM)、牛血清蛋白(FBS)、抗生素(青霉素和链霉素)和磷酸盐缓冲液(PBS),购于上海康生物科技有限公司。其他溶剂均为分析纯。

1.2 主要性能表征及仪器

核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)与核磁共振氟谱($^{19}\text{F-NMR}$):德国 Bruker AVANCE III 500 型核磁共振仪(400 MHz),在室温下测量,以四甲基硅烷(TMS)为内标,氘代(DMSO)/氘水(DMSO- d_6)/ D_2O 混合溶液为溶剂。

紫外-可见光吸收光谱(UV-Vis):日本 SHIMADZU 公司 UV-2550 型紫外-可见光光度计,样品溶液在比色皿中检测,扫描范围 300~900 nm。

荧光发射光谱:美国 Varian 公司 Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer 分光光度仪,激发波长 670 nm,激发和发射狭缝宽度均设为 20 nm。

纳米粒度分析:Beckman Coulter Delsa Nano C 纳米粒度仪。

粒径和形貌分析:采用 JEOL JEM 1400 型透射电子显微镜(TEM),工作电压为 100 kV。

激光共聚焦采用尼康 AIR 系列拍摄。

1.3 实验过程

1.3.1 Ac-HA-PFC-Pba 的制备 根据课题组前期工作以及文献方法^[5],首先将酶切寡聚透明质酸钠(500 mg)溶解在 20 mL 的甲酰胺中搅拌 10 min,加入吡啶(132 μL)和乙酸酐(120 μL),继续搅拌反应 24 h,透析冻干后得到白色样品 Ac-HA。然后将 Ac-HA 溶解在 20 mL 的 DMSO 里,剧烈搅拌 30 min,加入 DMAP(48.3 mg)

与 PFCs (198 mg), 冰浴下缓慢滴加 DCC (200 mg), 常温下反应 48 h, 透析冻干后得到白色样品 Ac-HA-PFC。再将 Ac-HA-PFC 溶解在 20 mL 的 DMSO 中, 搅拌 10 min, 加入 Pba (10 mg) 与 DMAP (48.3 mg), 冰浴下缓慢滴加 DCC (200 mg), 在常温下反应 48 h, 透析冻干后得到绿色样品 Ac-HA-PFC-Pba。

1.3.2 聚多巴胺纳米球的制备 参照文献 [30] 方法, 首先将多巴胺盐酸盐 (90 mg) 溶解在 45 mL 高纯水中, 搅拌溶解, 逐滴加入 475 μ L 1 mol/L 的 NaOH 溶液, 搅拌反应 24 h。反应结束后, 终产物 (PDANPs) 通过高速离心机 (14 000 r/min, 30 min) 收集并用高纯水水洗多次冻干得到。反应过程见图 1。

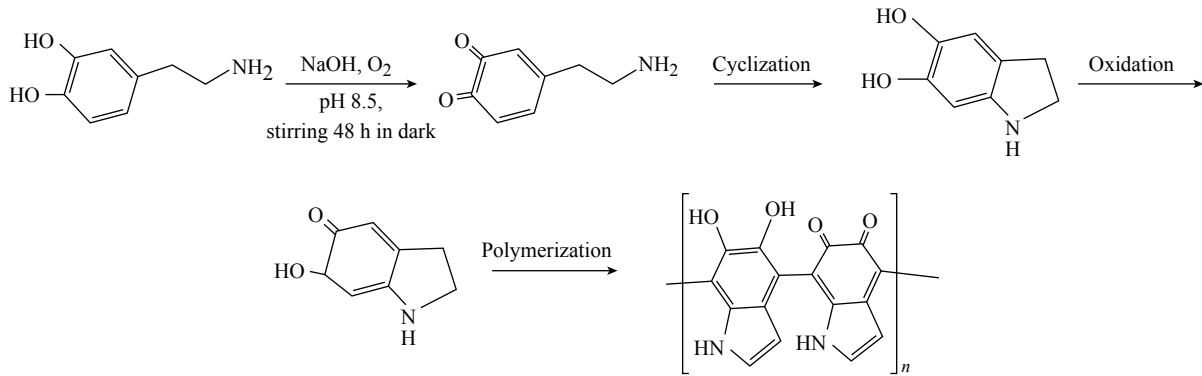


图 1 聚多巴胺纳米粒子的制备

Fig. 1 Synthesis of PDANPs

1.3.3 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的制备 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的制备主要通过金属配位作用, 其金属络合作用示意图见图 2。由图 2 可知, 首先合成 Fe^{3+} -PDANPs, 然后 Ac-HA-PFC-Pba 通过金属配位作用将 PDANPs 包裹在中间。为了合成 Fe^{3+} -PDANPs, 先将 PDANPs 在 6 mL 高纯水中搅拌溶解, 得到质量浓度为 5 mg/mL 的溶液, 向溶液里加入 60 μ L 三氯化铁溶液 (100 mg/mL), 搅拌 24 h, 透析得到纯化的 Fe^{3+} -PDVNP。最后将 5 mL 的 Ac-HA-PFC-Pba (5 mg/mL) 溶液与 5 mL 纯化后的 Fe^{3+} -PDANPs (5 mg/mL) 溶液混匀搅拌 24 h, 得到 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs。

1.3.4 粒径与形貌 将 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 以及 PDANPs 分别配成水溶液, 利用纳米粒度分析仪检测两个样品的粒径。

1.3.5 纳米粒子稳定性 制备 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 水溶液, 放置在室温环境中, 连续 7 d 取样利用粒径仪进行检测, 记录粒径大小。

1.3.6 紫外表征 将 PDA、PDANPs 和 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 分别配成水溶液, 利用紫外分光光度计检测 3 个样品的紫外-可见光吸收光谱, 吸收谱宽为 200~900 nm。

1.3.7 光热实验 制备具有相同聚多巴胺纳米粒子浓度的对照样 PDANPs、纯水和最终样 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs, 然后放置在 808 nm 的激光下, 利用光热检测仪器实时检测 10 min, 然后每隔 1 min 记录温度, 得到不同样品的温度与照射时间的曲线。

1.3.8 细胞毒性实验 选用 A549 细胞评估 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的细胞光暗毒性。首先以每孔 5×10^3 个细胞密度接种在 96 孔板中, 培养 24 h 后, 在孔板里分别加入相同浓度的 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs、PDANPs 和自由 Pba, 在培养基 DMEM 中于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h, 然后用质量分数为 10% 的 (4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物 (MTT) 溶液 (5 mg/mL) 的新鲜 DMEM 处理 4 h。最后, 去除含 MTT 的培养基, 向每个孔中加入 150 μ L DMSO, 轻轻搅拌 10 min 提取制品。用分光光度计酶标仪 (Thermo Multiskan MK3 光谱仪) 检测 492 nm 处的吸光度。细胞活力计算如下: 细胞存活率 = $(A_{OD, test}) /$

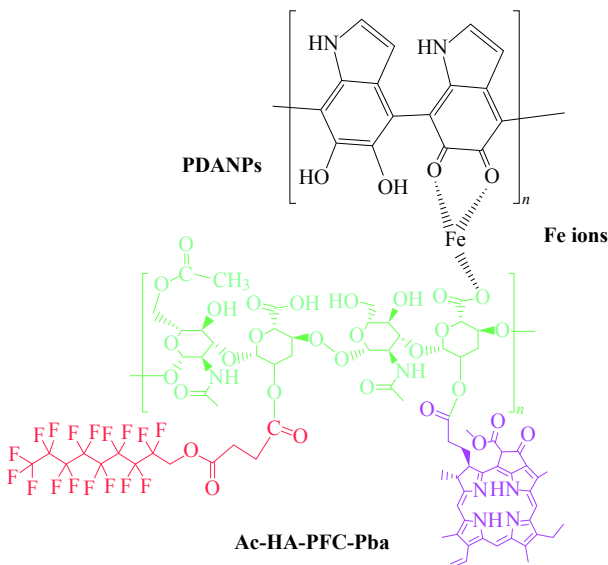


图 2 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 金属络合作用示意图

Fig. 2 Schematic of metal complexation of Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs

$(A_{OD,control}) \times 100\%$, 其中 $A_{OD,test}$ 为样品溶液的吸光度, $A_{OD,control}$ 为无处理溶液的吸光度。

使用上述类似的方法评估 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs、PDANPs 以及自由 Pba 的体外光毒性。先将样品加入孔板, 再将孔板暴露于可见光发光二极管灯的光 (400 mW/cm^2 , 660 nm) 下 10 min , 再置于激光 (2 W/cm^2 , 660 nm) 下 10 min 。然后将照射的细胞孔板换液, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下培养箱中继续孵育 24 h , 并且使用 MTT 法测定评估细胞生存率。

1.3.9 激光共聚焦成像实验 用激光共聚焦扫描显微镜 (CLSM, Nikon AIR) 监测 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs、PDANPs 以及自由 Pba 的细胞摄取行为。将细胞 A549 以每孔 5×10^4 个的密度接种在 6 孔板的无菌盖玻片上, 在 1 mL 的 DMEM 中培养 24 h 。然后加入规定量的样品, 并将细胞孵育 24 h 。除去培养基后, 将细胞用 PBS 洗涤 3 次。用质量分数为 4% 的多聚甲醛固定细胞 30 min , 用 PBS 洗涤 3 次。最后, 用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色细胞 3 min , PBS 洗 3 次。将盖玻片置于载玻片上进行成像。

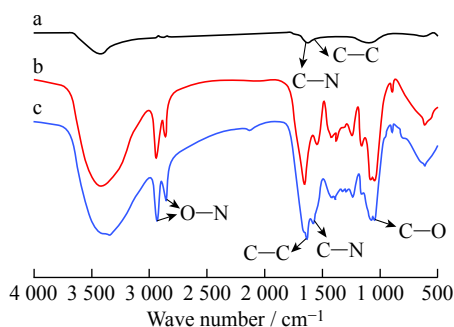
2 结果与讨论

2.1 Ac-HA-PFC-Pba 的表征

HA 是一种带有负电荷、线性的天然多糖, 是由交替的 β -1,3 和 β -1,4 糖苷键连接乙酰基-*D*-葡萄糖二糖单元和葡萄糖醛酸单元重复组成。由于其良好的生物相容性、可降解性、可修饰性等优点, 被广泛用于药物载体, 但其优良的亲水性限制了其在油相中的后续反应, 故引入乙酰基以增强其疏水性, 使其在有机相 DMSO 中可与 PFCs、自由 Pba 进行酯化反应。通过透明质酸乙酰化前后化学位移 1.9 处核磁峰强度对比, 表明乙酰化的程度是每两个葡萄糖环接 0.2 个乙酰基。通过 Ac-HA 与 PFC 的酯化反应制备得到 Ac-HA-PFC。由于接枝了氟化物, 更有利于 HA 在 DMSO 中溶解, 通过 Ac-HA-PFC 与自由 Pba 的进一步酯化作用, 得到绿色的 Ac-HA-PFC-Pba 终产物。PDANPs、Ac-HA-PFC-Pba 和 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的红外谱图见图 3。由图 3 可知, 在 2930 cm^{-1} 及 2860 cm^{-1} 处出现了透明质酸中 $-\text{COOH}$ 的羟基伸缩振动峰, 且在 1081 cm^{-1} 和 1050 cm^{-1} 处出现了酯基 $-\text{C}-\text{O}$ 的伸缩振动峰。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz , DMSO, δ): 2.01 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.42 (s, 1H, $-\text{OH}$), 1.71 (t, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 9.75 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{}$), 9.48 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{}$), 8.89 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{}$)。 $^{19}\text{F-NMR}$ (400 MHz , DMSO, δ): -80.21 (s,

3F , CF_3-), -118.48 (s, 2F, $-\text{CF}_2-$), -121.73 (s, 4F, $-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$), -122.46 (s, 4F, $-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$), -122.79 (s, 2F, $-\text{CF}_2-$), -125.72 (s, 2F, $-\text{CF}_2-$)。



a—PDANPs; b—Ac-HA-PFC-Pba; c—Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs

图3 PDANPs、Ac-HA-PFC-Pba、Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的红外谱图

Fig. 3 FTIR spectra of PDANPs, Ac-HA-PFC-Pba, Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs

2.2 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的表征

由图 3 可知, Ac-HA-PFC-Pba 的红外谱图在 1506 、 1622 cm^{-1} 处分别出现了吲哚-5, 6-醌上 C—N 较弱的弯曲振动峰及吲哚芳香环上 C—C 的伸缩振动峰, 在 2930 cm^{-1} 处和 $3300\text{--}3700 \text{ cm}^{-1}$ 处分别出现了 C—H 的伸缩振动峰及 N—H 和 O—H 的强伸缩振动峰, 1040 cm^{-1} 处为聚多巴胺上 CH 的面内弯曲振动峰, 符合聚多巴胺的分子结构, $2400\text{--}2800 \text{ cm}^{-1}$ 之间盐酸多巴胺的 N—H 的伸缩振动峰都消失了, 说明 NH_2 在聚多巴胺纳米颗粒的制备过程中发生了变化。由图 3 可知, Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 不仅具有 Ac-HA-PFC-Pba 在 2930 、 2860 cm^{-1} 处羧酸基中的 O—H 伸缩振动峰与在 1080 、 1050 cm^{-1} 处酯基的 C—O 伸缩振动峰, 还具有 PDANPs 在 1510 、 1620 cm^{-1} 处的 C—N、C—C 伸缩振动峰。上述现象证明了 Ac-HA-PFC-Pba 成功负载上了 PDANPs。

2.3 粒径与形貌

PDANPs 的透射电镜结果及 PDANPs 和 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的粒径分布如图 4 所示。由图 4 可见, PDANPs 为形貌均匀单一的单分散体系, 平均粒径为 100 nm 左右, 当其包覆上 Ac-HA-PFC-Pba 后, 平均粒径为 160 nm 左右, 有利于细胞的胞吞作用。

2.4 纳米粒子稳定性

将 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 放置在室温环境中进行稳定性测试, 结果见图 5。从图 5 可以看出, 随着时间的变化, Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的粒径均在 160 nm 左右, 变化很小, 这说明采用盐酸多巴胺制备的 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 分散性良好, 不易聚集,

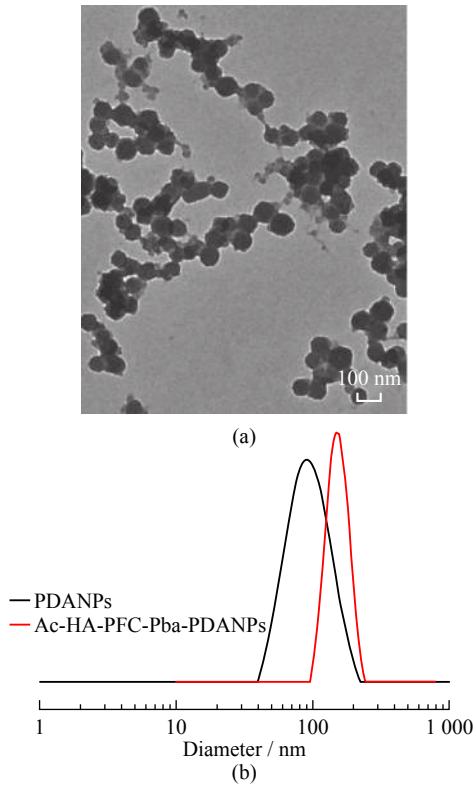


图 4 PDANPs 的透射电镜照片(a)和 PDANPs 和 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 在水溶液中的粒径分布图(b)

Fig. 4 TEM image of PDANPs (a) and size distribution of PDANPs and Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs in aqueous solution (b)

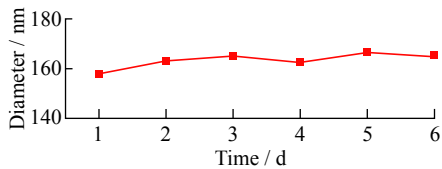


图 5 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的粒径稳定性

Fig. 5 Particle size stability of Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs

在水溶液能够保持一定程度的稳定。由于聚多巴胺的独特结构, Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 表面亲水性好, 能够避免被网状内皮系统 (RES) 捕获和吞噬, 因而能够实现在体内长循环。此外, 纳米粒子生物利用度与其表面亲水性相关联, 亲水性好的纳米粒子具有更好的溶解性能, 从而提高其生物利用度。这些性质使 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 有望用于癌症治疗。

2.5 紫外表征

盐酸多巴胺在碱性条件下会发生自氧化聚合作用, 导致多巴胺的光学吸收性质发生化, 紫外-可见 (UV-Vis) 吸收光谱 (图 6) 显示, 聚多巴胺纳米颗粒在 280 nm 处的吸收峰强度大幅度减弱, 而且紫外可见吸收光谱的吸收范围延伸到近红外区, 通过金属配位作用包覆上 Ac-HA-PFC-Pba 后, 紫外可见光谱显示出自由 Pba 的吸收峰分别在 420 nm 和 660 nm

处。说明该体系满足光热与光动力协同治疗的光吸收性质的基本要求。

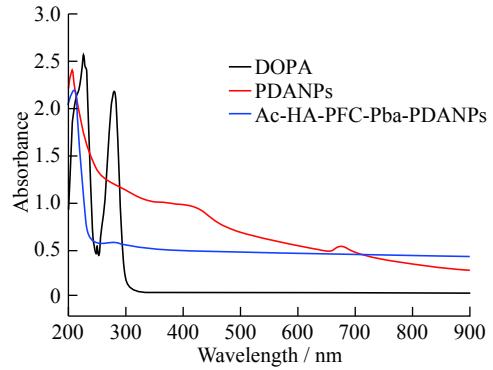


图 6 DOPA、PDANPs 和 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 在水溶液中的紫外-可见光光谱

Fig. 6 UV-Vis absorption spectra of DOPA, PDANPs and Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs in aqueous solution

2.6 聚多巴胺纳米粒子的光热表征

以波长为 808 nm 的激光为光源, 考察了悬浮液的温度随照射时间的变化 (图 7), 经过 10 min 的持续照射后, 1 mL 质量浓度为 2.5 mg/mL 的 PDANPs 悬浮液温度升到 43.2 °C, 升高了 15.4 °C, 样品 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 悬浮液温度为 44.2 °C, 升高了 15.7 °C, 而对对照组纯水的温度只升高了 1.5 °C。由此判断, 聚多巴胺纳米粒子与 Ac-HA-PFC-Pba 包载的聚多巴胺纳米粒子体系能够安全有效地应用于光热治疗, 而且聚多巴胺包覆上 Ac-HA-PFC-Pba 外层并不影响其光热能力, 可实现光动力与光热协同治疗的效果。

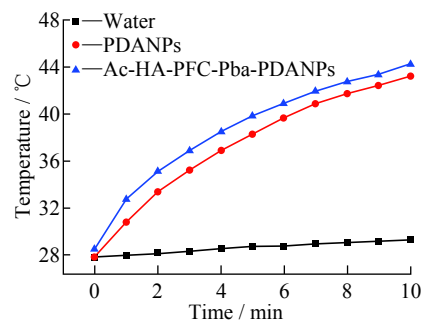


图 7 PDANPs 和 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的温度-时间曲线

Fig. 7 Temperature-time profiles of PDANPs and Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs

2.7 细胞毒性实验

不同质量浓度的 PDANPs、Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 溶液中 A549 细胞的活性如图 8 所示, 当聚多巴胺纳米颗粒质量浓度高达 100 μg/mL 时, 细胞活性仍维持在 90% 左右, 说明当聚多巴胺纳米颗粒作

用于癌细胞且质量浓度低于 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞毒性很低。在癌细胞光热处理实验中,选择质量浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以避免聚多巴胺纳米颗粒本身毒性的干扰。同时也评估了 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的暗毒性和光毒性。

如图 8 所示,由于 HA 与 PDANPs 优良的生物相容性,Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 显示较弱的细胞暗毒性。当用波长 660 nm 的激光照射 10 min 后,随着自由 Pba 浓度的增加,光毒性逐渐增强。本文检测到在 PDANPs、Ac-HA-PFC-Pba 和 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 处理情况下,细胞的存活率都有所下降,而且 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 与 Ac-HA-PFC-Pba、PDANPs 相比,存活率下降得更明显,这说明了 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 具有较强的光热与光动力协同作用,比光动力与光热单独治疗具有更好的治疗效果。

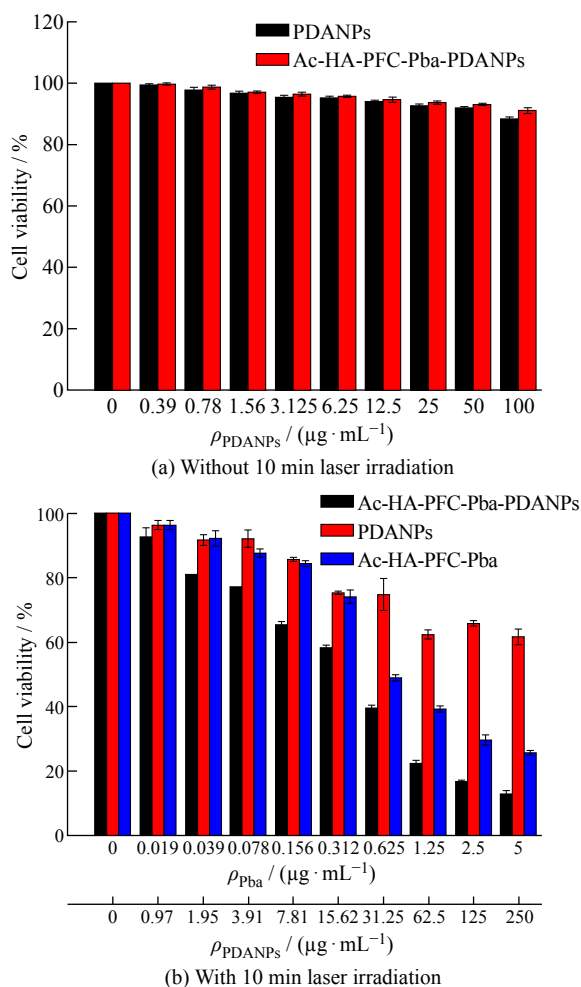
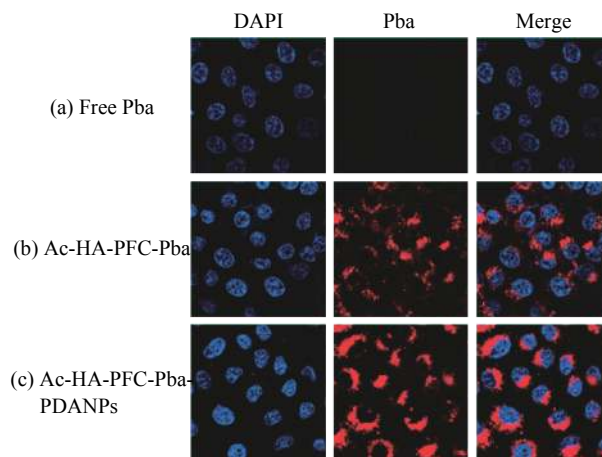


图 8 MTT 法检测不同质量浓度的 PDANPs、Ac-HA-PFC-Pba 和 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 纳米粒子对细胞 A549 的毒性

Fig. 8 Toxicity of A549 cells measured by the MTT assay with various mass concentrations of PDANPs, Ac-HA-PFC-Pba and Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs

2.8 激光共聚焦实验

激光共聚焦扫描显微镜被用来进一步探究自由 Pba、Ac-HA-PFC-Pba、Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 的细胞摄取行为。细胞 A549 在脱镁叶绿素质量浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 下分别用自由 Pba、Ac-HA-PFC-Pba、Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 培养 24 h , 在确定时间间隔后,将细胞核用 DAPI 着色。从图 9 的 CLSM 结果可以看出,当培养 24 h 后,检测到很明显的荧光信号。同时,发现 Ac-HA-PFC-Pba、Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 荧光强度都要比自由 Pba 的荧光强度高。这个结果表明胶束和纳米粒子更容易被细胞摄取。而且,本文观察到 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 荧光强度比 Ac-HA-PFC-Pba 胶束的荧光强度高,这可能是由于聚多巴胺纳米粒子与透明质酸材料毒性低以及生物相容性比较好,有助于实现细胞内吞作用,导致 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs 更容易被细胞摄取。



The final mass concentration of Pba was $5 \mu\text{g}/\text{mL}$; The nucleus was stained with DAPI showing blue fluorescence and red fluorescence as Pba signals

图 9 细胞 A549 处理 24 h 后激光共聚焦照片

Fig. 9 CLSM images of A549 cells incubated with free Pba for 24 h

3 结论与展望

本文成功设计合成了一种生物可降解的肿瘤靶向自供氧光热与光动力协同治疗的纳米颗粒体系 Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs, 由于 PFC 的高氧亲和性,解决了在乏氧肿瘤区域的氧气不足的问题,通过负载氧气至肿瘤区域从而提高了光动力治疗效果,同时利用低毒性的 HA, 达到肿瘤靶向的效果。另外,通过负载具有优良光热转换性能的 PDANPs, 从而在长循环中能有效猝灭光敏剂荧光和单线态氧,而在肿瘤区域 HA 被降解,从而光敏剂猝灭恢复,达到靶

向肿瘤的增强光热与光动力协同治疗效果, 为乏氧肿瘤治疗提供了一个新的思路。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics[J]. *A Cancer Journal of Clinicians*, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] PEER D, KARP J M, HONG S, *et al*. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy[J]. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2(12): 751-760.
- [3] 刘宏, 薛金萍, 黄金陵, 等. 肿瘤光动力治疗临床应用的光敏剂及其研究概况[J]. *应用化学*, 2013, 30(12): 1386-1392.
- [4] JOHN J V, CHUNG C W, JOHNSON R P. Dual stimuli-responsive vesicular nanospheres fabricated by lipopolymer hybrids for tumor-targeted photodynamic therapy[J]. *Bio-macromolecules*, 2016, 17(1): 20-31.
- [5] LI F Y, BYOUNGCHAN B, KUN N A. Acetylated hyaluronic acid/photosensitizer conjugate for the preparation of nanogels with controllable phototoxicity: Synthesis, characterization, autophotoquenching properties, and in Vitro phototoxicity against HeLa cells[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2010, 21(7): 1312-1320.
- [6] MAAS A L. Tumor vascular microenvironment determines responsiveness to photodynamic therapy[J]. *Cancer Research*, 2012, 72: 2079-2088.
- [7] HENDERSEN B W, FINGAR V H. Relationship of tumour hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumour[J]. *Cancer Research*, 1987, 47: 3110-3114.
- [8] HOCKEL M, VAUPEL P. Tumour hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects[J]. *Journal of National Cancer Institute*, 2001, 93: 266-276.
- [9] HARRIS A L. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2: 38-47.
- [10] MODERY P, TIAN V, GUPTA A S. Synthetic approaches to RBC mimicry and oxygen carrier systems[J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14: 939-948.
- [11] CHENG Y, CHENG H, JIANG C, *et al*. Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8785-8792.
- [12] JIN C S, LOVELL J F, CHEN J, *et al*. Ablation of hypoxic tumors with dose-equivalent photothermal, but not photodynamic, therapy using a nanostructured porphyrin assembly[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(3): 2541-2550.
- [13] GENG J, SUN C, LIU J, *et al*. Biocompatible conjugated polymer nanoparticles for efficient photothermal tumor therapy[J]. *Small*, 2015, 11(13): 1603-1610.
- [14] CHENG L, YANG K, CHEN Q, *et al*. Organic stealth nanoparticles for highly effective *in vivo* near-infrared photothermal therapy of cancer[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(6): 5605-5613.
- [15] ELDRIGE B N, BERNISH B W, FAHRENHOLT C D, *et al*. Photothermal therapy of glioblastoma multiforme using multiwalled carbon nanotubes optimized for diffusion in extracellular space[J]. *ACS Biomaterial Science Engineering*, 2016, 2: 963-967.
- [16] SUGIURA T, MATSUKI D, OKAJIMA J, *et al*. Photothermal therapy of tumors in lymph nodes using gold nanorods and near-infrared laser light with controlled surface cooling[J]. *Nano Research*, 2015, 8(12): 3842-3852.
- [17] LI L, LIANG K, HUA Z, *et al*. A green route to water-soluble polyaniline for photothermal therapy catalyzed by iron phosphates peroxidase mimic[J]. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(12): 2290-2296.
- [18] LEE M Y, LEE C, JUNG H S, *et al*. Biodegradable photonic melanoidin for theranostic applications[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(1): 822-831.
- [19] JU K Y, LEE S, PYO J, *et al*. Bio-inspired development of a dual-mode nanoprobe for MRI and raman imaging[J]. *Small*, 2015, 11: 84-89.
- [20] LIN L S, CONG Z X, CAO J B, *et al*. Multifunctional Fe₃O₄@polydopamine core-shell nanocomposites for intracellular mRNA detection and imaging-guided photothermal therapy[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(4): 3876-3883.
- [21] LIU Y, AI K, LIU J, *et al*. Dopamine melanin colloidal nanospheres: An efficient near-infrared photothermal therapeutic agent for *in vivo* cancer therapy[J]. *Advance Materials*, 2013, 25: 1353-1359.
- [22] 闫孟飞, 韩霞, 刘洪来. 基于聚多巴胺原位还原修饰的 SiO₂@PDA@Au 复合材料的制备及催化性能[J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2017, 43(1): 16-22,35.
- [23] QIANG W, LI W, LI X, *et al*. Bioinspired polydopamine nanospheres: A superquencher for fluorescence sensing of biomolecules[J]. *Chemical Science*, 2014, 5: 3018-3024.
- [24] CASTRO C I, BRICENO J C. Perfluorocarbon-based oxygen carriers: Review of products and trials[J]. *Artificial Organs*, 2010, 34: 622-634.
- [25] QUE Y R, LIU Y J, TAN W, *et al*. Enhancing photodynamic therapy efficacy by using fluorinated nanoplateform[J]. *ACS Macro Letters*, 2016, 5: 168-173.
- [26] 林静, 张瑞, 韩森, 等. 一种新型 CO₂ 响应型肿瘤靶向药物传递载体[J]. *功能高分子学报*, 2017, 30(3): 327-332.
- [27] UNDERHILL C. CD44: The hyaluronan receptor[J]. *Cell Science*, 1992, 103: 293-298.
- [28] ENTWISTLE J, HALL C, TURLEY E. HA receptors: Regulators of signalling to the cytoskeleton[J]. *Cell Biochemistry*, 1996, 61(4): 569-577.
- [29] 黄雅佩, 黄培森, 陈小东, 等. 铁蛋白重链亚基纳米载药系

统的构建及其特性[J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2015, 41(5): 629-635.

[30] JU K Y, LEE Y, LEE S, *et al.* Bioinspired polymerization of

dopamine to generate melanin-like nanoparticles having an excellent free-radical-scavenging property[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12: 625-632.

Polydopamine-Loaded Fluorinated Hyaluronic Acid (HA) Photosensitizer Nanoparticles for Synergetic Photodynamic and Photothermal Therapy of Hypoxic Tumors

TIAN Jun, ZHANG Weian

(School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: With the increasing of morbidity and mortality, cancer has become one of the leading causes of death worldwide. Photodynamic therapy (PDT) kills cancer cells by using reactive singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) which is produced from photosensitizer by light activation, and has been widely utilized for many localized and superficial cancer treatments over the past four decades. The three major components of PDT are light, photosensitizer, and tissue oxygen. In PDT treatment, oxygen depletion and inherent hypoxia microenvironment in solid tumors may lead to further hypoxia, which in turn can hinder PDT efficacy. However, photothermal therapy (PTT) is not affected by the hypoxic environment, and has gained widespread attention owing to its noninvasive and low toxicity. Polydopamine nanoparticles (PDANPs) were utilized as a PTT agent for tumor treatment because of its good biocompatibility and high photothermal conversion efficiency. Here, we created a PDT-PTT system by grafting perfluorocarbon and photosensitizer into the hyaluronic acid (HA) chains and loading the PDANPs (Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs). This PDT-PTT system consisted of a PDANPs core and a fluorinated HA photosensitizer shell. The synthesized Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs had a relatively narrow particle size distribution (around 160 nm), and can be easily endocytosed by cancer cells. Furthermore, an efficient photothermal conversion function for PTT was also shown in the Ac-HA-PFC-Pba-PDANPs system. It raised up to 45 °C to kill cancer cells in a short time. With the excellent photothermal conversion ability of PDANPs, the high oxygen affinity of perfluorocarbon segments and the tumor targeting of HA, this system provides superior therapeutic efficacy against cancer cells. The anti-tumor effect was significantly improved, which was confirmed by cytotoxicity test and cell uptake studies. This novel nanoparticle provides a promising approach for synergetic PDT-PTT of hypoxic tumors.

Key words: oxygen self-carrying; perfluorocarbon; polydopamine; photodynamic therapy; photothermal therapy