

doi: 10.3969/j.issn.2095-0411.2024.04.010

负载新吲哚菁绿的还原响应性聚合物胶束 增强肿瘤光动力治疗

胡 航, 肖 文, 陶亚宇, 杜坤达, 袁晓音, 徐德锋

(常州大学 药学院, 江苏 常州 213164)

摘要: 首先合成了二硫键连接的甲氧基聚乙二醇-胆固醇偶联物 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH, 然后通过溶剂扩散法制备了 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 这两种载新吲哚菁绿 (New indocyanine green, IR820) 胶束, 可以显著提高 IR820 在生理环境下的稳定性。体外药物释放研究显示两种载 IR820 胶束均具有还原响应性释放特性, 细胞摄取研究表明 IR820@mPEG2000-SS-CH 比游离 IR820 和 IR820@mPEG5000-SS-CH 具有更高的细胞摄取量, 体外细胞实验显示 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 具有良好的生物相容性, IR820@mPEG2000-SS-CH 比游离 IR820 和 IR820@mPEG5000-SS-CH 具有更强的肿瘤细胞光动力杀伤作用。研究制备的 IR820@mPEG2000-SS-CH 为提高 IR820 稳定性和肿瘤光动力治疗作用提供了新的选择。

关键词: 新吲哚菁绿; 光动力治疗; 聚乙二醇; 胆固醇; 胶束; 还原响应性

中图分类号: R 94

文献标志码: A

文章编号: 2095-0411(2024)04-0082-11

New indocyanine green-loaded reduction responsive polymeric micelles for enhanced cancer photodynamic therapy

HU Hang, XIAO Wen, TAO Yayu, DU Kunda, YUAN Xiaoyin, XU Defeng

(School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: In this study, disulfide bonded methoxypolyethylene glycol-cholesterol conjugates mPEG5000-SS-CH and mPEG2000-SS-CH were synthesized. The two types of IR820-loaded micelles, IR820@mPEG5000-SS-CH and IR820@mPEG2000-SS-CH, which might significantly improve the stability of IR820 in physiological environment, were prepared by solvent diffusion method. While vitro studies show that both mPEG5000-SS-CH and mPEG2000-SS-CH have reduction-responsive re-

收稿日期: 2024-02-15。

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究面上资助项目 (20KJB350005); 常州市重点研发计划资助项目 (CJ20210030)。

作者简介: 胡航 (1989—), 男, 安徽蚌埠人, 博士, 助理研究员。通信联系人: 徐德锋 (1968—), E-mail: markxu@cczu.edu.cn

引用本文: 胡航, 肖文, 陶亚宇, 等. 负载新吲哚菁绿的还原响应性聚合物胶束增强肿瘤光动力治疗[J]. 常州大学学报 (自然科学版), 2024, 36(4): 82-92.

lease characteristics and good biocompatibility, IR820@mPEG2000-SS-CH displays enhanced cellular uptake and photodynamic killing effect on tumor cells as compared to free IR820 and IR820@mPEG5000-SS-CH. The study suggests that IR820@mPEG2000-SS-CH could be a new choice with superior stability and cancer photodynamic therapeutic effect to IR820.

Key words: new indocyanine green; photodynamic therapy; polyethylene glycol; cholesterol; micelles; reduction responsiveness

光动力治疗 (Photodynamic therapy, PDT) 在 1978 年首次成功应用于临床, 引起人们广泛关注。传统的光动力治疗包括 3 大要素, 即光敏剂、光源和氧气, 光敏剂在光源的照射下激发并敏化氧分子, 产生单线态氧, 从而对肿瘤造成杀伤作用。光动力治疗除了可以直接杀死肿瘤细胞、破坏肿瘤血管, 还具有免疫调节作用, 可以作为辅助疗法联合化疗、放疗和免疫治疗等, 增强肿瘤杀伤作用, 也可以单独用于多种肿瘤的治疗^[1-3]。与手术切除、放疗、化疗、分子靶向治疗和免疫治疗等肿瘤治疗方法相比, 光动力治疗具有非侵入、光源靶向和低毒等特点^[4-5]。光敏剂对于光动力治疗至关重要, 吲哚菁绿是一种被美国 FDA 批准的影像剂, 也被用于慢性牙周炎光动力治疗的临床研究^[6]。但是吲哚菁绿的稳定性差, 在水溶液中容易分解^[7-8]。新吲哚菁绿 (New indocyanine green, IR820) 是在吲哚菁绿结构基础上改造而来, 具有更好的稳定性, 且比吲哚菁绿具有更高的单线态氧量子产率, 在光动力治疗中具有较好的应用前景^[9-10]。但是 IR820 应用于光动力治疗仍有一些问题, 例如在生理环境下容易聚集、肿瘤细胞摄取效率低和血浆半衰期短等^[11-13]。

通过纳米药物递送系统负载光敏剂以改善光敏剂的稳定性和体内行为是目前研究的热点。目前文献中已报道有多种载 IR820 纳米制剂, 但是仍存在肿瘤细胞摄取效率低、释放不可控或具有潜在的生物相容性问题等缺陷^[14-15]。为此, 研究将临床中已广泛应用的甲氧基聚乙二醇和内源性小分子胆固醇通过二硫键偶联, 合成具有还原响应性的甲氧基聚乙二醇-胆固醇偶联物, 然后通过溶剂扩散法制备了载 IR820 胶束, 用于增强 IR820 的光动力治疗作用。研究测定了所制备载 IR820 胶束的载药量、封装率、粒径和电位, 研究了载 IR820 胶束的稳定性、体外药物释放行为、体外光动力效应、肿瘤细胞摄取行为和体外对肿瘤细胞的光动力杀伤作用。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

胆固醇 (CH)、3, 3'-二硫代二丙酸 (DTDPA)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDCI)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、1, 3-二苯基异苯并呋喃 (DPBF)、3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、新吲哚菁绿 (IR820) 和 2, 7-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 磷酸盐缓冲液 (6.7 mmol/L, pH 为 7.4)、高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素和链霉素购自 Gibco 公司; 甲氧基聚乙二醇 (mPEG-OH 相对分子质量 2 000 和 5 000) 购自深圳市魅罗科技有限公司; 小鼠成纤维细胞 NIH3T3 和人类肝癌细胞 HepG2 购自中国科学院细胞库。

采用 Bruker 公司 AVANCE II 500 MHz 核磁共振波谱仪记录核磁共振氢谱 (^1H NMR); 采用 Thermo 公司 iS50 傅里叶变换红外光谱仪记录红外光谱 (FT-IR); 采用武汉市华天电力自动化有限责任公司的 HTYZL-H 全自动张力测定仪测定表面张力; 采用 Tecan 公司 Spark 多功能酶标仪测量吸光度和荧光强度; 采用尼康公司 TI-S 倒置生物显微镜进行荧光成像; 采用英国马尔文仪器有限公

司 ZSE 激光粒度仪测量粒径和电位。

1.2 化学合成与表征

将 3, 3'-二硫代二丙酸 (2 mmol, 420 mg)、胆固醇 (1 mmol, 387 mg)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (4 mmol, 767 mg) 和 4-二甲氨基吡啶 (1 mmol, 122 mg) 溶于 20 mL 二氯甲烷, 加热回流过夜, 旋干后加入少量乙酸乙酯溶解, 加入至过量乙醇中沉淀、搅拌, 然后过滤, 乙醇洗涤, 真空干燥得 3, 3'-二硫代二丙酸单胆固醇酯 (CH-DTDPA) (高效液相色谱测得纯度为 97%)。

将 3, 3'-二硫代二丙酸单胆固醇酯 (0.2 mmol, 116 mg)、甲氧基聚乙二醇 (相对分子质量 5 000, 0.2 mmol, 1 000 mg 或相对分子质量 2 000, 0.2 mmol, 400 mg)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (0.8 mmol, 153 mg) 和 4-二甲氨基吡啶 (0.2 mmol, 24 mg) 溶于 20 mL 二氯甲烷中, 加热回流 24 h, 然后旋干, 加入超纯水分散, 于超纯水中透析 3 d, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液冷冻干燥得二硫键连接的甲氧基聚乙二醇-胆固醇偶联物 (mPEG-SS-CH) (高效液相色谱测得纯度为 92%~95%)。

分别称取 10 mg CH-DTDPA, mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 溶于氘代氯仿, 测量核磁共振氢谱。分别称取 5 mg mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 与溴化钾共同研磨、压片, 测定红外光谱。配置 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 水溶液, 通过测定表面张力的方法测量临界胶束质量浓度。

1.3 载药纳米粒的制备和性能测定

称取 20 mg IR820 和 200 mg mPEG5000-SS-CH 或 mPEG2000-SS-CH, 加入至 2 mL 二甲基亚砜中, 室温避光搅拌过夜, 然后逐滴加入至 20 mL 超纯水中, 边滴加边超声, 滴加完毕后继续超声 5 min, 然后于超纯水中避光透析 3 d, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液避光冷冻干燥得 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH。称取 IR820@mPEG5000-SS-CH 或 IR820@mPEG2000-SS-CH 冻干粉, 溶于 1 mL 二甲基亚砜, 测量 760 nm 处吸光度, 通过标准曲线法测得 IR820 的质量浓度, IR820 的载药量为载药纳米粒上负载的 IR820 的质量分数, IR820 的包封率为 IR820 投料量中负载的 IR820 的质量分数。配置 IR820 质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 水溶液, 测量紫外-可见吸收光谱。配置 IR820 质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 磷酸盐缓冲液 (6.7 mmol/L, pH 为 7.4), 室温避光孵育, 每天测量 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的粒径和电位, 测量 6 d, 每天拍照记录各样品外观, 记录 5 d。

1.4 体外药物释放

配置 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 磷酸盐缓冲液 (10 mmol/L, pH 为 7.4), 加入至透析袋中, 放入磷酸盐缓冲液 (10 mmol/L, pH 为 7.4) 或含有 10 mmol/L GSH 的磷酸盐缓冲液 (10 mmol/L, pH 为 7.4) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下在摇床中避光震荡 (150 r/min), 在 2, 4, 6, 16, 24, 40, 48 h 分别取出 1 mL 的释放液, 再补充 1 mL 的空白释放液, 测量 760 nm 处吸光度, 通过标准曲线法测得 IR820 的质量浓度, 计算 IR820 的累积释放量。

1.5 体外光动力效应

配置 DPBF 质量浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 、IR820 质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的游离 IR820, IR820@

mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的水溶液, 分别用激光功率为 0.25 W/cm^2 、波长为 808 nm 的激光照射 1, 2, 3, 4, 5 min, 测量 405 nm 处吸光度, 以不加激光照射的相应溶液作为对照对各组吸光度进行归一化。配置 DPBF 质量浓度为 $40 \mu\text{g/mL}$, IR820 质量浓度为 5, 10, $20 \mu\text{g/mL}$ 的游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 水溶液, 分别用功率为 0.25 W/cm^2 、波长为 808 nm 的激光照射 3 min, 测量 405 nm 处吸光度, 以不加激光照射的相应溶液作为对照对各组吸光度进行归一化。

1.6 细胞摄取

小鼠成纤维细胞 NIH3T3 和人类肝癌细胞 HepG2 使用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素及链霉素的高糖 DMEM 培养基, 于细胞培养箱中培养 (37°C , 5% 二氧化碳)。将 HepG2 细胞以每孔 10 万个细胞的密度接种于 12 孔板, 贴壁培养过夜, 然后将培养基换成含游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的无血清培养基 (IR820 质量浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$), 于细胞培养箱中 37°C 条件下培养 6 h, 然后吸去培养基, 用磷酸盐缓冲液 (6.7 mmol/L , pH 7.4) 洗涤细胞 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 通过荧光显微镜观察各组细胞中新卟啉菁绿的荧光。

将 HepG2 细胞以每孔 10 万个细胞的密度接种于 12 孔板, 培养过夜贴壁, 然后将培养基换成含游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的无血清培养基 (IR820 质量浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$), 于细胞培养箱中 37°C 条件下培养 4 h 和 6 h, 然后吸去培养基, 用磷酸盐缓冲液 (6.7 mmol/L , pH 为 7.4) 洗涤细胞 3 次, 加入胰酶消化细胞, 然后离心分离细胞, 加入 1% 曲拉通 X-100 溶液裂解细胞过夜, 然后离心 10 min ($10\,000 \text{ r/min}$), 取上清测量 760 nm 处吸光度, 通过标准曲线法测得裂解液中新卟啉菁绿的质量浓度, 计算细胞摄取量。

1.7 细胞毒性和光动力杀伤作用

在 HepG2 细胞上评价游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的光动力杀伤作用。将 HepG2 细胞以每孔 5 000 个细胞的密度接种于 96 孔板, 培养过夜贴壁, 然后将培养基换成含有游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的无血清培养基, 于细胞培养箱中 37°C 条件下培养 4 h, 然后用功率为 0.25 W/cm^2 或 0.50 W/cm^2 、波长为 808 nm 的激光照射 3 min, 再于细胞培养箱中 37°C 条件下培养 20 h, 加入 $20 \mu\text{L}$ 噻唑蓝溶液 (5 mg/mL), 于细胞培养箱中 37°C 条件下培养 4 h, 吸去培养基, 加入 $150 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜, 溶解产生的紫色结晶, 然后通过酶标仪测量吸光度, 以空白培养基培养的细胞为 100% 生存率, 计算各组细胞相对存活率。通过细胞活力检测 (MTT) 法研究了空载体对 NIH3T3 细胞的毒性。

1.8 细胞活性氧水平

在 HepG2 细胞上通过活性氧绿色荧光探针 DCFH-DA 评价游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 处理的细胞在 808 nm 激光照射下引起的细胞活性氧水平升高情况。DCFH-DA 本身无荧光, 进入细胞后被酯酶水解生成 $2', 7'$ -二氯二氢荧光素, 后者可以被活性氧快速氧化生成强荧光产物 $2', 7'$ -二氯荧光素, 从而实现细胞内活性氧的荧光检测。将 HepG2 肝癌细胞以每孔 10 万个细胞的密度接种于 12 孔板, 培养过夜贴壁, 然后将培养基换成含有游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的无血清培养基 (IR820 质量浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$), 于细胞培养箱中 37°C 条件下培养 4 h, 然后吸去培养基, 用磷酸盐缓冲液 (6.7 mmol/L , pH 为 7.4) 洗涤细胞 3 次, 加入含 $5 \mu\text{g/mL}$ DCFH-DA 的培养基, 孵育 20 min, 然后吸去培养基, 用磷酸

盐缓冲液 (6.7 mmol/L, pH 为 7.4) 洗涤细胞 3 次, 用 0.25 W/cm^2 , 808 nm 激光照射 3 min, 照射完毕后, 通过荧光显微镜观察各组细胞中的绿色荧光。

将 HepG2 肝癌细胞以每孔 10 万个细胞的密度接种于 12 孔板, 培养过夜贴壁, 然后将培养基换成含有游离 IR820, IR820 @ mPEG5000-SS-CH 和 IR820 @ mPEG2000-SS-CH 的无血清培养基 (IR820 质量浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$), 于细胞培养箱中 37°C 条件下培养 4 h, 然后吸去培养基, 用磷酸盐缓冲液 (6.7 mmol/L, pH 为 7.4) 洗涤细胞 3 次, 加入含 $5 \mu\text{g/mL}$ DCFH-DA 培养基, 孵育 20 min, 然后吸去培养基, 用磷酸盐缓冲液 (6.7 mmol/L, pH 为 7.4) 洗涤细胞 3 次, 用 0.25 W/cm^2 , 808 nm 激光照射 3 min, 照射完毕后, 加入 0.5 mL 1% 曲拉通 X-100 溶液裂解细胞过夜, 然后离心 10 min ($10\,000 \text{ r/min}$), 取上清液测量 525 nm 处荧光, 激发波长为 485 nm, 以空白培养基培养的细胞作为对照对各组细胞活性氧水平进行归一化。

2 结果与讨论

2.1 合成与表征

mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 的合成路线如图 1 (a) 所示, 胆固醇首先与 3, 3'-二硫代二丙酸缩合得到 3, 3'-二硫代二丙酸单胆固醇酯 (CH-DTDPA), 然后再分别与相对分子质量为 5 000 和 2 000 的甲氧基聚乙二醇缩合即可得到 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH。除了胆固醇的特征峰外, CH-DTDPA 的核磁共振氢谱在 2.93 和 2.70 处出现了 3, 3'-二硫代二丙酸中的亚甲基峰 (图 1 (b)), 表明 CH-DTDPA 的成功合成。与 CH-DTDPA 的核磁共振氢谱相比, mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 的核磁共振氢谱中出现了 PEG 的峰, 表明 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 的成功合成。mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 的红外光谱中均出现了酯键中的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰 ($1\,730 \text{ cm}^{-1}$) (图 1 (c)), 表明胆固醇和甲氧基聚乙二醇与 3, 3'-二硫代二丙酸通过酯键偶联, 以上结果显示 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 被成功合成。

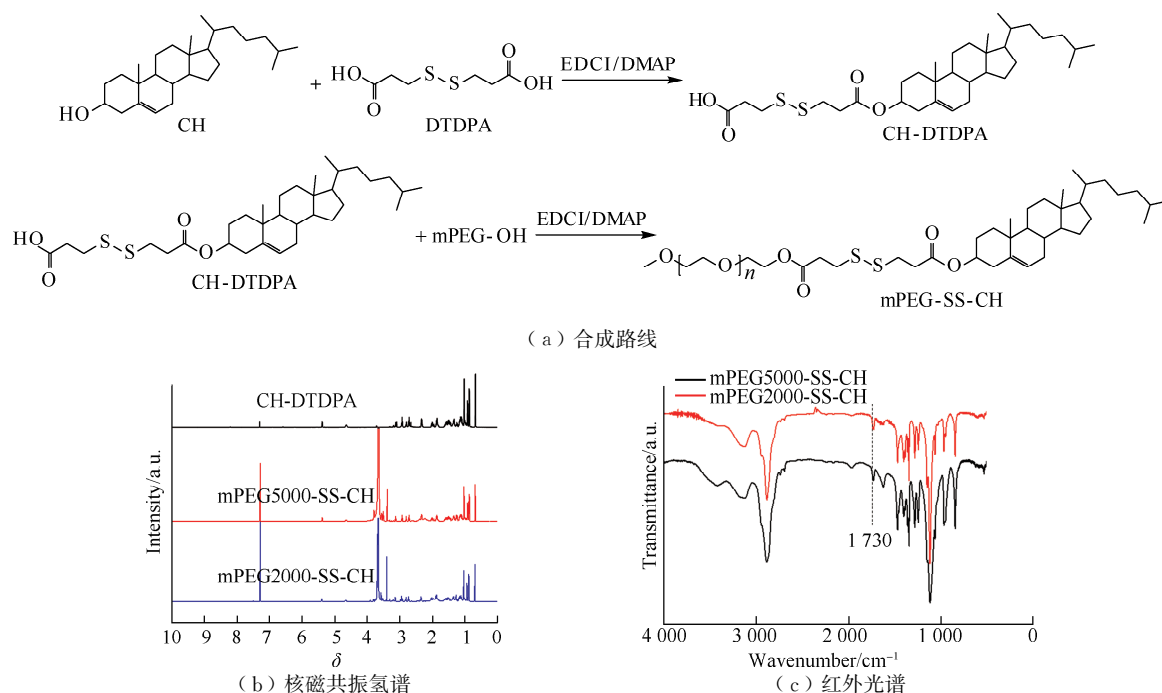


图 1 mPEG-SS-CH 的合成与表征

Fig.1 Synthesis and characterization of mPEG-SS-CH

通过表面张力法测定了 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 的临界胶束质量浓度。如图 2 所示, mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 水溶液的表面张力均随着质量浓度的增加而降低, 通过线性拟合的相交点得到 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 的临界胶束质量浓度分别为 $4.23 \mu\text{g/mL}$ 和 $4.45 \mu\text{g/mL}$, 如此低的临界胶束质量浓度有利于 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 在血液稀释的条件下仍然保持稳定的胶束结构。

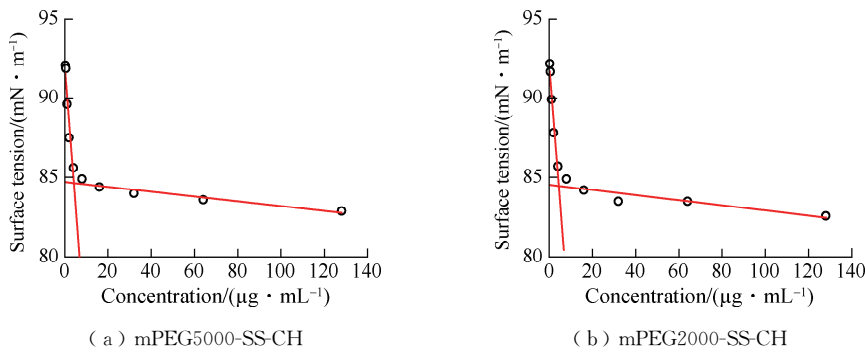


图 2 表面张力法测定临界胶束质量浓度

Fig.2 Measurement of critical micelle concentration by surface tension method

2.2 载药纳米粒制备、表征与稳定性

通过溶剂扩散法将 IR820 负载于 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 胶束中, 制备得到 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH, 见表 1。IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的水合直径 (D_h) 分别为 $(229.0 \pm 7.3) \text{ nm}$ 和 $(192.5 \pm 1.8) \text{ nm}$, 多分散性指数 (λ_{PDI}) 均小于 0.3, 表明具有较窄的粒径分布, Zeta 电位分别为 $-(15.8 \pm 1.1) \text{ mV}$ 和 $-(12.7 \pm 0.5) \text{ mV}$ 。由于大部分的血浆蛋白带有负电荷, 因此 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的 Zeta 负电位有利于其通过静电排斥作用抑制蛋白吸附, 逃避网状内皮系统的清除, 从而有利于延长血液驻留时间。IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的载药量分别为 4.2% 和 7.1%, 包封率分别为 46.2% 和 78.0%, IR820@mPEG2000-SS-CH 的载药量和包封率高于 IR820@mPEG5000-SS-CH, 主要是由于 mPEG2000-SS-CH 中疏水段的比例高于 IR820@mPEG5000-SS-CH, 有利于与 IR820 发生疏水相互作用。

表 1 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的水合粒径和电位

Table 1 Hydrodynamic diameter and potential of IR820@mPEG5000-SS-CH and IR820@mPEG2000-SS-CH

载药纳米粒	D_h/nm	λ_{PDI}	Zeta potential/mV
IR820@mPEG5000-SS-CH	229.0 ± 7.3	0.277 ± 0.005	$-(15.8 \pm 1.1)$
IR820@mPEG2000-SS-CH	192.5 ± 1.8	0.256 ± 0.018	$-(12.7 \pm 0.5)$

IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的紫外-可见吸收光谱如图 3 (a) 所示, 与游离 IR820 相比, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的最大吸收波长分别红移了 44 nm 和 53 nm, 表明 IR820 负载于 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 胶束的疏水内核中。IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的粒径均呈正态分布 (图 3 (b)), 且具有良好的胶体稳定性, 在磷酸盐缓冲液中孵育 6 d, 粒径和电位均没有明显的变化 (图 3 (c) 和图 3 (d))。如图 3 (e) 所示, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 在磷酸盐缓

冲液中孵育 5 d, 仍保持良好的稳定性, 而游离 IR820 孵育 1 d 即出现明显沉淀。以上结果显示 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 可以显著提高 IR820 在生理条件下的稳定性, 主要由于 IR820 负载于 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 胶束的疏水内核中, 避免了 IR820 与水 and 盐直接接触。

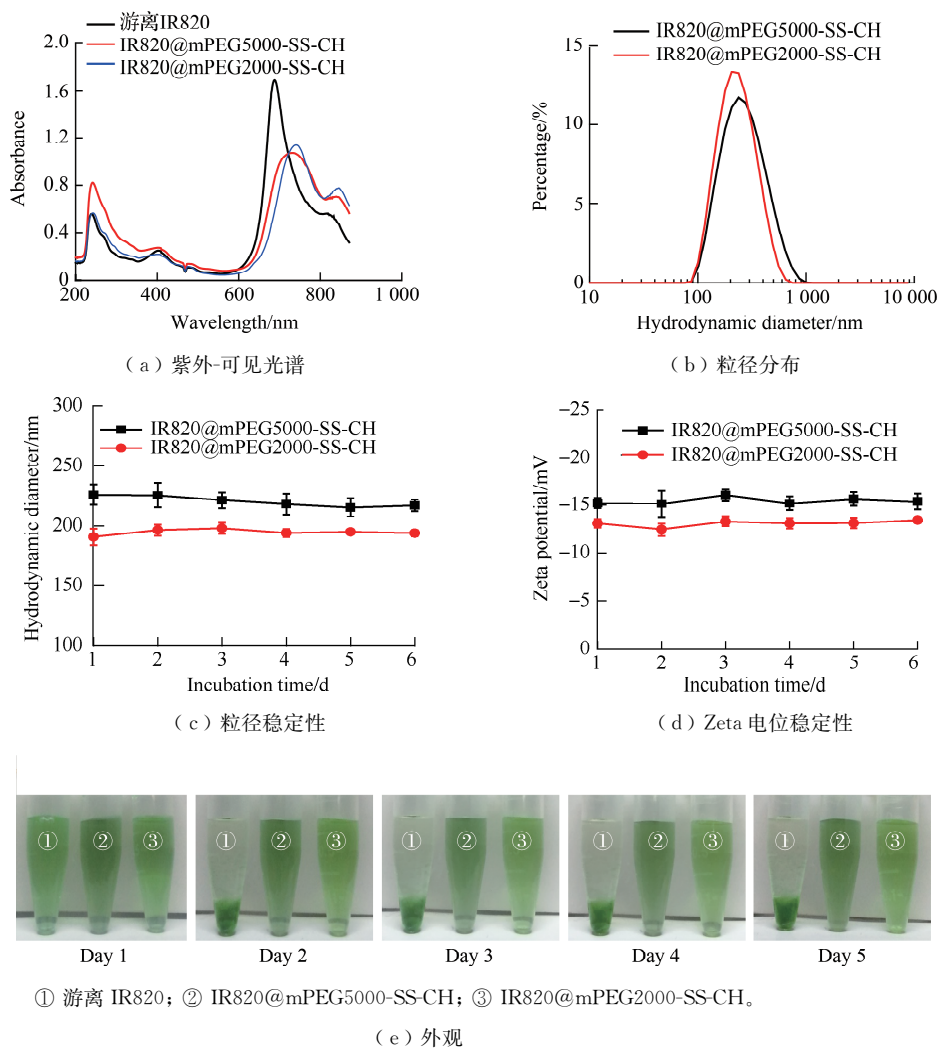


图 3 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的表征和稳定性

Fig.3 Characterization and stability of IR820@mPEG5000-SS-CH and IR820@mPEG2000-SS-CH

2.3 体外药物释放

通过透析法在体外研究了 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的药物释放行为。如图 4 所示, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 在磷酸盐缓冲液和含有 10 $\mu\text{mol/L}$ GSH 的磷酸盐缓冲液中释放缓慢, 而在含有 10 mmol/L GSH 的磷酸盐缓冲液中可以快速释放。在磷酸盐缓冲液中, IR820@mPEG5000-SS-CH 在 6, 24, 48 h 分别释放了 $(20.8 \pm 1.2)\%$, $(30.5 \pm 2.9)\%$ 和 $(32.9 \pm 2.7)\%$ 的 IR820; 在含有 10 $\mu\text{mol/L}$ GSH 的磷酸盐缓冲液中, IR820@mPEG5000-SS-CH 在 6, 24, 48 h 分别释放了 $(23.5 \pm 3.2)\%$, $(33.4 \pm 1.3)\%$ 和 $(38.8 \pm 1.9)\%$ 的 IR820; 在含有 10 mmol/L GSH 的磷酸盐缓冲液中, IR820@mPEG5000-SS-CH 在 6, 24, 48 h 分别释放了 $(46.1 \pm 3.9)\%$, $(61.1 \pm 5.5)\%$ 和 $(73.4 \pm 4.3)\%$ 的 IR820, IR820@mPEG2000-SS-CH 的释放略慢于 IR820@mPEG5000-SS-CH, 释放趋

势与 IR820@mPEG5000-SS-CH 类似。以上结果显示 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 具有还原响应性释放 IR820 的功能,有利于 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 在血液循环中保持稳定,在肿瘤细胞内高浓度 GSH 微环境下选择性释放 IR820。

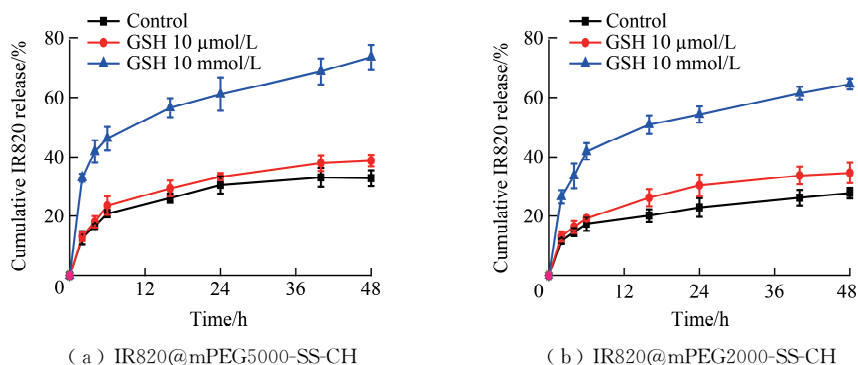


图4 体外药物释放曲线

Fig.4 In vitro drug release curves

2.4 体外光动力效应

通过单线态氧探针 DPBF 研究了 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 在 0.25 W/cm^2 , 808 nm 激光照射下产生单线态氧量的情况, DPBF 可以和单线态氧反应分解, 导致吸光度降低, DPBF 在 405 nm 处吸光度降低越多, 表明产生的单线态氧量越多。如图 5 所示, 游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 在 0.25 W/cm^2 , 808 nm 激光照射下产生单线态氧量均具有时间依赖性和质量浓度依赖性, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 产生单线态氧效率略高于游离 IR820, 可能是由于 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的最大吸收波长与 808 nm 激光更匹配所导致。

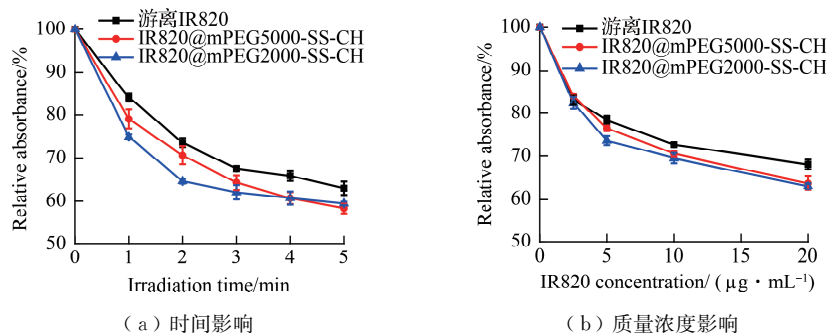


图5 激光照射下产生单线态氧量的情况

Fig.5 Generation of singlet oxygen upon laser irradiation

2.5 细胞摄取

通过荧光显微镜研究了 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的肿瘤细胞摄取 (图 6)。由图 6 (a) 可知, 与 HepG2 细胞孵育 6 h, IR820@mPEG2000-SS-CH 处理的细胞比 IR820@mPEG5000-SS-CH 和游离 IR820 处理的细胞具有更强的红色荧光, 表明 IR820@mPEG2000-SS-CH 的细胞摄取量高于 IR820@mPEG5000-SS-CH 和游离 IR820。细胞摄取定量结果显示, 与 HepG2 细胞孵育 4,

6 h, IR820@mPEG2000-SS-CH 的细胞摄取量均显著高于游离 IR820 ($*p<0.05$, $**p<0.01$), 在 6 h, IR820@mPEG2000-SS-CH 的细胞摄取量还显著高于 IR820@mPEG5000-SS-CH (图 6 (b), $*p<0.05$)。以上结果显示, IR820@mPEG2000-SS-CH 可以显著提高 IR820 的肿瘤细胞摄取。

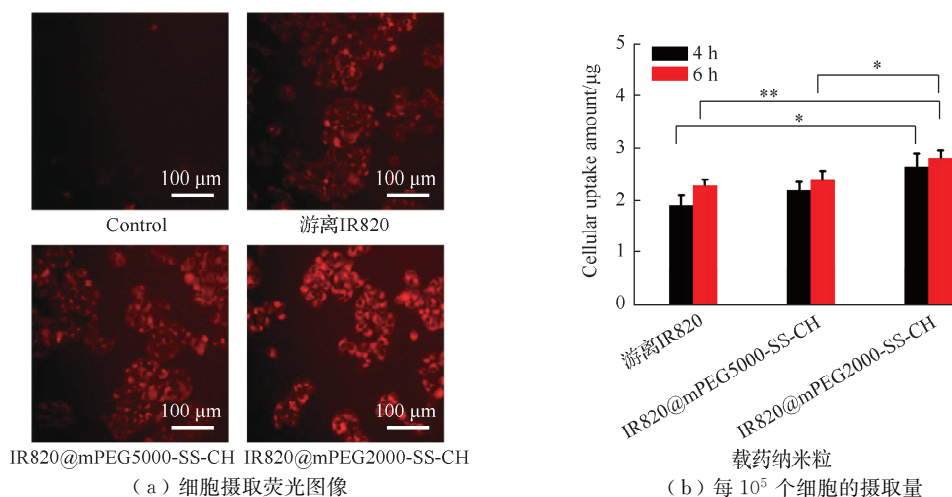


图 6 HepG2 细胞摄取

Fig.6 Cellular uptake on HepG2 cells

2.6 细胞毒性和光动力杀伤作用

如图 7 所示, 在 NIH3T3 细胞上研究了 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 的生物相容性。如图 7 (a) 所示, mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 质量浓度增加到 $800 \mu\text{g}/\text{mL}$, 细胞存活率仍高于 90%, 表明 mPEG5000-SS-CH 和 mPEG2000-SS-CH 具有良好的生物相容性。在不加激光照

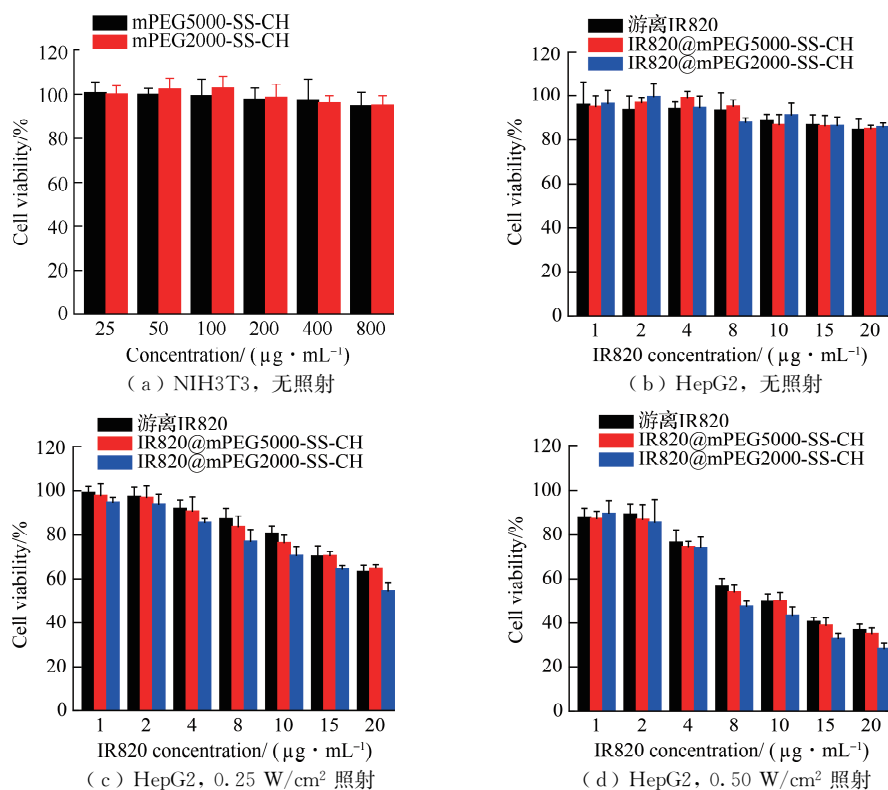


图 7 细胞毒性和光动力杀伤作用

Fig.7 Cytotoxicity and photo-killing effect

射条件下,游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 处理的 HepG2 细胞存活率均高于 80% (图 7 (b)),表明游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 在不加激光照射条件下细胞毒性微弱。在 0.25 W/cm², 808 nm 和 0.50 W/cm², 808 nm 激光照射条件下,游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 对 HepG2 细胞的光动力杀伤作用均具有浓度依赖性,且在 0.50 W/cm² 照射功率条件下光动力杀伤作用高于 0.25 W/cm² 照射功率条件(图 7(c)和图 7(d)),根据图 7 (c) 和图 7 (d)计算出相应的半抑制浓度(IC₅₀),见表 2, IR820@mPEG2000-SS-CH 的半抑制浓度低于 IR820@mPEG5000-SS-CH 和游离 IR820,表明 IR820@mPEG2000-SS-CH 比 IR820@mPEG5000-SS-CH 和游离 IR820 具有更强的光动力杀伤作用,主要由于 IR820@mPEG2000-SS-CH 的细胞摄取量高于 IR820@mPEG5000-SS-CH 和游离 IR820 (图 6)。

表 2 载药纳米粒在 808 nm 激光照射条件下对 HepG2 细胞的半抑制浓度

载药纳米粒	半抑制浓度	
	nm laser irradiation	
	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	0.25 W/cm ² 照射	0.50 W/cm ² 照射
游离 IR820	29.54	10.97
IR820@mPEG5000-SS-CH	32.33	10.31
IR820@mPEG2000-SS-CH	26.01	8.35

2.7 细胞活性氧水平

通过活性氧 (ROS) 绿色荧光探针 DCFH-DA 检测在 0.25 W/cm², 808 nm 激光照射条件下,游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 处理的 HepG2 细胞活性氧水平。由图 8 (a) 可知,IR820@mPEG2000-SS-CH 处理的细胞荧光强度高于 IR820@mPEG5000-SS-CH 和游离 IR820 处理的细胞,定量结果也显示 IR820@mPEG2000-SS-CH 处理的细胞活性氧水平显著高于 IR820@mPEG5000-SS-CH (***p*<0.01) 和游离 IR820 (***p*<0.01) 处理的细胞 (图 8 (b))。这一结果与 HepG2 细胞的光动力杀伤作用结果相一致,表明游离 IR820, IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 在 808 nm 激光照射下通过提高肿瘤细胞活性氧水平发挥杀伤肿瘤细胞作用。

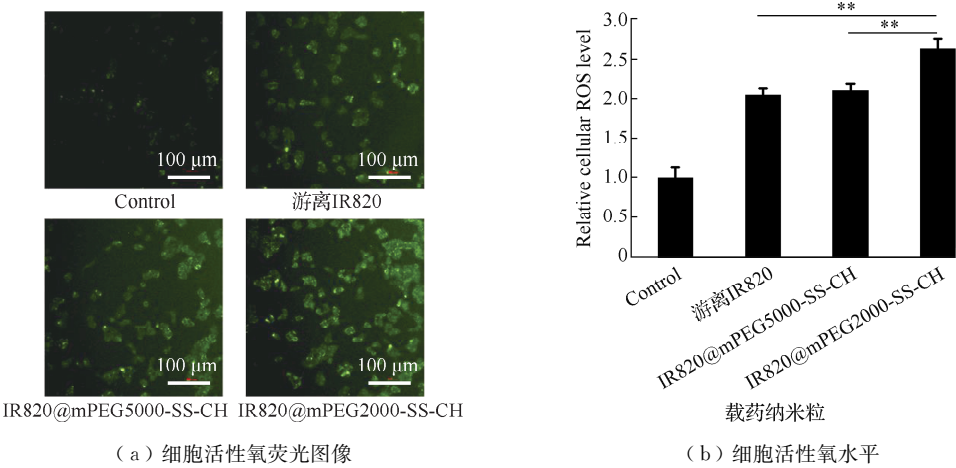


图 8 细胞活性氧检测
Fig.8 Detection of cellular reactive oxygen species

3 结 论

综上所述,研究制备了两种还原响应性聚合物胶束,用于负载 IR820,增强 IR820 的光动力治疗作

用。制备的 IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 可以显著提高 IR820 在生理环境下的稳定性,具有还原响应性药物释放特性,其中 IR820@mPEG2000-SS-CH 比 IR820@mPEG5000-SS-CH 和游离 IR820 具有更高的细胞摄取量和肿瘤细胞光动力杀伤作用,且载体生物相容性良好。IR820@mPEG5000-SS-CH 和 IR820@mPEG2000-SS-CH 的体内光动力治疗作用有待进一步探索。

参考文献:

- [1] LI X S, LOVELL J F, YOON J, et al. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2020, 17(11): 657-674.
- [2] NAM J, SON S, PARK K S, et al. Cancer nanomedicine for combination cancer immunotherapy[J]. *Nature Reviews Materials*, 2019, 4(6): 398-414.
- [3] INOUE T, ISHIHARA R. Photodynamic therapy for esophageal cancer[J]. *Clinical Endoscopy*, 2021, 54(4): 494-498.
- [4] YAN K, ZHANG Y B, MU C L, et al. Versatile nanoplateforms with enhanced photodynamic therapy: designs and applications[J]. *Theranostics*, 2020, 10(16): 7287-7318.
- [5] LIU X M, LI R H, ZHOU Y L, et al. An all-in-one nanoplateform with near-infrared light promoted on-demand oxygen release and deep intratumoral penetration for synergistic photothermal/photodynamic therapy[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2022, 608(2): 1543-1552.
- [6] JOSHI K, BAIJU C S, KHASHU H, et al. Clinical effectiveness of indocyanine green mediated antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to scaling root planing in treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2020, 29: 101591.
- [7] HU H, CHEN J T, YANG H, et al. Potentiating photodynamic therapy of ICG-loaded nanoparticles by depleting GSH with PEITC[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(13): 6384-6393.
- [8] HU H, XIAO C, WU H L, et al. Nanocolloidosomes with selective drug release for active tumor-targeted imaging-guided photothermal/chemo combination therapy [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(48): 42225-42238.
- [9] HOU X Y, TAO Y K, LI X X, et al. CD44-targeting oxygen self-sufficient nanoparticles for enhanced photodynamic therapy against malignant melanoma[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 10401-10416.
- [10] FU J J, LI C W, LIU Y, et al. The microneedles carrying cisplatin and IR820 to perform synergistic chemo-photodynamic therapy against breast cancer[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 146-151.
- [11] LI W T, PENG J R, TAN L W, et al. Mild photothermal therapy/photodynamic therapy/chemotherapy of breast cancer by Lyp-1 modified docetaxel/IR820 Co-loaded micelles[J]. *Biomaterials*, 2016, 106: 119-133.
- [12] LIU H, WANG J J. Loading IR820 using multifunctional dendrimers with enhanced stability and specificity[J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(3): 77-83.
- [13] NAGESSETTI A, SRINIVASAN S, MCGORON A J. Polyethylene glycol modified ORMOSIL theranostic nanoparticles for triggered doxorubicin release and deep drug delivery into ovarian cancer spheroids[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2017, 174: 209-216.
- [14] HE X Y, HONG J, LIU S P, et al. Hydroxyethyl starch-new indocyanine green conjugates for enhanced cancer photodynamic therapy[J]. *Carbohydrate Research*, 2021, 508: 108416.
- [15] 顾怡雯, 左甜甜, 张君, 等. 共载多西他赛和 IR820 的化疗/光热/光动纳米粒的抗肿瘤增殖及转移作用考察[J]. *中国医药工业杂志*, 2020, 51(4): 490-498.

(责任编辑:周安迪)