

文章编号: 1000-7032(2024)09-1560-08

基于单线态氧荧光传感的微流控光动力疗法研究

孙煜然, 彭洪尚*

(中央民族大学 理学院, 北京 100081)

摘要: 光动力疗法(PDT)作为一种新型的光疗技术,具有非侵入性和毒副作用小的优点,在临床医学上具有重要的应用前景。目前PDT研究主要基于静态培养的肿瘤细胞,其与实际肿瘤微环境差异明显因而往往导致PDT临床疗效不佳。本文设计开发一种微流控生物芯片用于肿瘤PDT,并制备荧光纳米传感器($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$)对PDT过程单线态氧的产生进行荧光传感,分析影响PDT灭活肿瘤细胞的主要因素。结果表明,培养基pH由7.4减小至6.8(环境酸化)以及注射流量由5 $\mu\text{L/h}$ 增加到20 $\mu\text{L/h}$ (剪切应力增大)均会降低肿瘤细胞对纳米光敏剂的吞噬效率;PDT初期氧含量充足($<30 \text{ s}$),光敏药物剂量、微酸化和力学微环境的差异对单线态氧的产率影响不大,细胞抑制率接近;PDT后期(30~180 s)氧含量下降,单线态氧产率下降,不同的肿瘤微环境参量产生的细胞光毒性差异明显。该工作通过荧光传感探究了模拟肿瘤微环境下PDT过程中单线态氧的产生情况,为推进肿瘤PDT的临床发展提供了有益的参考。

关键词: 荧光传感; 单线态氧; 微流控芯片; 光动力疗法

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20240145

Microfluidic Photodynamic Therapy Based on Singlet Oxygen Fluorescence Sensing

SUN Yuran, PENG hongshang*

(School of Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

* Corresponding Author, E-mail: hshpeng@bjtu.edu.cn

Abstract: Photodynamic therapy (PDT), as a new type of phototherapy technology, has the advantages of non-invasive and low toxic side effects, and has important application prospects in clinical medicine. Currently, PDT research is mainly based on statically cultured tumor cells, which significantly differ from the actual tumor microenvironment and often lead to poor clinical efficacy of PDT. This paper designs and develops a microfluidic biochip for tumor PDT, and prepares a fluorescent nanosensor ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) to fluorescently sense the production of singlet oxygen during the PDT process, analyzing the main factors affecting the inactivation of tumor cells by PDT. The results show that reducing the pH of the culture medium from 7.4 to 6.8 (environmental acidification) and increasing the injection flow rate from 5 $\mu\text{L/h}$ to 20 $\mu\text{L/h}$ (increased shear stress) both reduce the phagocytic efficiency of tumor cells towards nano photosensitizers. In the early stage of PDT, the oxygen content is sufficient ($<30 \text{ s}$), and the differences in photosensitizer dosage, microacidification, and mechanical microenvironment have little effect on the yield of singlet oxygen. The cell phototoxicity is similar. In the late stage of PDT (30~180 s), the oxygen content decreases, the yield of singlet oxygen decreases, and different tumor microenvironment parameters result in different cellular phototoxicity. This work explores the production of singlet oxygen during PDT in a simulated tumor microenvironment through fluorescence sensing, providing useful references for promoting the clinical development of tumor PDT.

Key words: fluorescence sensing; singlet oxygen; microfluidic chip; photodynamic therapy

收稿日期: 2024-06-05; 修订日期: 2024-06-24

基金项目: 国家自然科学基金(62175266)

Supported by National Natural Science Foundation of China(62175266)

1 引言

癌症因其居高不下的年新增病例数量与死亡病例数量,目前依旧严重威胁着人类的生命健康^[1]。传统治疗癌症的方式存在明显的局限性,其副作用与并发症更是大大提高了癌症治疗的门槛^[2]。光动力疗法(PDT)不仅具有副作用小的优势,且对于癌症晚期阶段也具有一定的治疗效果,因此在肿瘤治疗的相关生物医学领域具有重要的意义^[3]。

光敏剂、光源、氧气是PDT三要素。当光敏剂吸收特定波长光子时,光敏剂会从基态被激活到激发态,其直接与分子氧相互作用形成单线态氧(Singlet oxygen, $^1\text{O}_2$),进而杀死肿瘤细胞^[4]。经过几十年的发展,光敏剂数次迭代更新,尤其是纳米技术的进步使得光敏剂的靶向性、治疗效果大幅提升^[5-6]。例如,金纳米笼搭载无机材料、过氧化氢酶来缓解肿瘤中的乏氧问题^[7],上转换纳米颗粒通过反斯托克斯发射过程来解决PDT光源穿透问题^[8-9],纳米金属有机骨架材料用于克服荧光猝灭效应^[10-11]。尽管在光敏剂方面已经取得很大进展,但由于肿瘤微环境的复杂性使得目前肿瘤PDT的临床推广依旧困难重重。其一,肿瘤微环境的组织乏氧、微酸化、弱还原性等特点,抑制了PDT中活性氧的毒性,进而降低了肿瘤治疗效果。对应的策略多是将PDT与光热疗法、化学动力疗法、免疫疗法等进行联合,通过多模式疗法来提高肿瘤治疗效果^[12]。其二,通常的PDT方案是基于体外静态培养的二维肿瘤细胞进行筛选,其与人体内实体瘤环境差异巨大,使得PDT的实体肿瘤治疗效果不佳^[13]。

微技术的高速发展使其有望成为一个能高效、高实用性、高准确度来复现人体肿瘤微环境的工具^[14]。这一技术经过十数年的发展,已经在PDT的各个方向取得相当喜人的成果^[15-16]。例如,有研究人员构建了一种单次实验可以得到包含氧气、光敏剂、光强度多种实验数据的多功能芯片实验平台来进行高通量药物筛选^[17];Chen等利用微流控芯片进行血管重建来研究中性粒细胞的外渗^[18];Wimalachandra等构建了一个血管-肿瘤微流控模型来研究多功能纳米颗粒对免疫细胞的招募能力^[19]。因此,利用微流控技术使得细胞的体外培养环境能够更加接近人体内肿瘤微环境,对于推进PDT在临床上的应用方面具有重要意义。

但由于微流控芯片结构的特殊性与细胞培养的轻量化,对微流控芯片的相关研究难以使用酶标仪、细胞流式术等常规方式进行表征^[20],而通过荧光传感对光动力治疗过程中产生的 $^1\text{O}_2$ 进行实时监测,为在微流控芯片上对PDT疗效进行评估提供了一种新的思路。

本文首先利用再沉淀-包覆法制备了负载酞菁锌(ZnPc)的纳米光敏剂以及负载1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)的 $^1\text{O}_2$ 荧光纳米传感器;然后设计并制作微流控生物芯片,在其中完成细胞的培养与纳米粒子的装载;最后通过调控微流控参数研究微酸化和力学微环境对ZnPc纳米粒子的吞噬效率以及PDT功效的影响,并利用DPBF纳米粒子对PDT过程中 $^1\text{O}_2$ 的产生进行实时传感,研究影响 $^1\text{O}_2$ 产率的主要因素。

2 实验

2.1 微流控芯片上的细胞培养及PDT给药方案筛选

微流控芯片上采用一次性注入法培养肿瘤细胞。首先对芯片预处理,将芯片放在紫外光下照射2 h后,通过微注射泵先注射酒精消毒,随后使用0.1 mg/mL的PLL溶液填满培养腔室,等待芯片晾干后备用。然后,注入人宫颈癌细胞(Hela),采用细胞计数法获取 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 高浓度Hela细胞悬液,在充分吹打后尽可能快地将细胞通过微注射泵以 $100 \mu\text{L/s}$ 的速度注入微流控芯片中。在细胞注入后每8 h在每个培养通道以不大于 $80 \mu\text{L/min}$ 的速度注入至少 $6 \mu\text{L}$ (大于通道容积)的培养液。

针对每个培育有Hela细胞的培养通道,以不大于 $80 \mu\text{L/min}$ 的速度注入至少 $6 \mu\text{L}$ (大于通道容积)的培养液(注入3个通道的培养液中分别含有8, 12, 16 $\mu\text{g/mL}$ 的ZnPc纳米粒子),共孵育12 h后用660 nm波长激发光(功率:6 mW)分别辐照1, 3, 5 min进行PDT。之后采用钙黄绿素(Calcein-AM)/碘化丙啶(PI)细胞双染试剂盒对细胞进行染色。

2.2 微流控参量调控与PDT实验

利用HCl调节完全培养基(由DMEM高糖培养基、胎牛血清、双抗混合制备, $\text{pH} = 7.4$)的pH值,并配制不同pH的ZnPc纳米粒子悬浊液($12 \mu\text{g/mL}$; $\text{pH} = 6.8, 7.1$),分别与Hela细胞共孵育12 h,再用PBS将培养腔室冲洗干净。利用共

聚焦显微镜对不同 pH 纳米光敏剂作用后的 HeLa 细胞进行荧光成像。选择 pH=7.4 的 ZnPc 纳米粒子培养液,采用微流量注射泵分别以 100, 200, 300 $\mu\text{L/h}$ 的流量对芯片持续注射 10 h。而后利用 PBS 对培养腔室进行洗涤,利用共聚焦显微镜对芯片上的 HeLa 细胞进行成像。

在微流控装置上进行光动力治疗,光辐照采用 660 nm 激光 (6 mW),辐照时间 2 min; ZnPc 纳米粒子给药剂量为 12 $\mu\text{g/mL}$ (pH=7.4, 7.1, 6.8)。流量分别采用 5, 10, 20 $\mu\text{L/h}$ 。对 PDT 作用后的肿瘤细胞进行活死染荧光成像。

2.3 在微流控装置上单线态氧探针荧光衰减实验

在微流控装置中完成在细胞上的两种纳米粒子搭载,然后分别在不同通道中注入 pH 值为 7.1 和 6.8 的培养基,并继续培育细胞 1 h; PDT 开始时向芯片内持续注入流量分别为 5, 10, 20 $\mu\text{L/min}$ 的 PBS 缓冲液。PDT 过程中利用共聚焦显微镜对 $^1\text{O}_2$ 的产生进行实时监测,进行时间序列荧光图像拍摄 (激发波长 405 nm, 采集范围 440~500 nm), 间隔为 1 s, 采集图像的平均灰度。拍摄开始 2 min 后利用 660 nm 激光进行照射,同时流量实验组同步向芯片的不同通道持续注入不同流速的 PBS 缓冲液,最终得到不同条件下的 DPBF 纳米粒子荧光衰减曲线。

3 结果与讨论

3.1 微流控芯片制备

本文的目的是在微流控芯片上进行肿瘤细胞培养、给药方案筛选与微参量调控。为此,设计了具有 3 个独立的培养腔室的微流控装置,腔室间由窄小的微通道相互连接,且 3 个腔室之间的连通与否可以通过流体流量控制。当雷诺数较低时,流体通常呈现层流状态,流体的流动以平行的层状进行^[21]。对于微流控芯片的主通道而言,微流控芯片中的流体流速与毛细血管相仿 (0.1~1 mm/s) 时,雷诺数为 0.094 以下,满足层流的要求^[22]。据此通过 CAD 进行掩模版的设计 (如图 1(a) 所示),通过套刻制备出高度不同但相互连通的通道,并设计对位标记。整个芯片有 3 对出入口,1、2、3 为注入口,4、5、6 为出液口,主通道宽 1 000 μm ,高 100 μm ,微通道则是 40 对长 500 μm 、宽 20 μm 、高 15 μm 的矩形通道 (如图 1(b) 所示)。芯片的主体采用生物相容性较好的聚二

甲基硅氧烷 (PDMS),并通过软光刻技术制成,芯片实物如图 1(c) 所示。

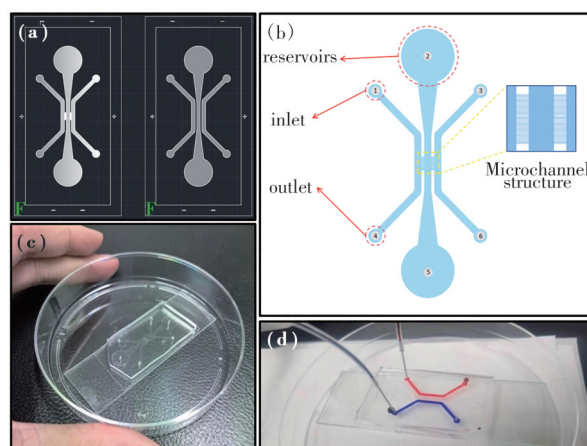


图 1 微流控生物芯片:(a)掩模版设计图,(b)结构示意图,(c)微流控芯片实物照片,(d)功能验证图片。左右两通道分别注入红蓝墨水(注入流量为 100 $\mu\text{L/s}$),中间通道不做处理

Fig.1 Microfluidic biochip: (a) mask design diagram, (b) structural diagram, (c) physical photos of microfluidic chips, (d) function verification image. Inject red and blue ink into the left and right channels respectively (with a flow rate of 100 $\mu\text{L/s}$), the middle channel is not processed

芯片制作完成后,将红蓝墨水分别注入左右两侧的培养腔室主通道中 (如图 1(d) 所示), 1 min 后通道内依旧呈现两条均匀色带,通道中没有产生气泡,主通道腔室中没有任何颜色的墨水,说明注入的流体没有突破微通道的压力阻碍。因此,三个培养腔室虽然由微通道相互连接、彼此互通,但对该芯片注入与毛细血管流速相仿的培养基时,可以认为流体在通道中保持层流,流经微通道不会影响、污染其他培养腔室。

3.2 基于纳米粒子的微流控芯片 PDT 研究

ZnPc 是具有较高 $^1\text{O}_2$ 产率与低细胞毒性的一种光敏剂^[23],但其在生理环境中易聚集而导致 $^1\text{O}_2$ 产率下降,因此采用共沉淀-包覆法将其制备成水溶性 ZnPc 纳米粒子 (制备方法与合成机理详见补充文件)^[24]。利用 DLS、TEM 等方法对纳米颗粒进行表征,其表面带正电,呈球形,粒径约 90 nm 左右 (补充文件图 S1)。图 2(a) 为 ZnPc 纳米粒子的吸收光谱,可以看出其在 660 nm 吸收峰的宽化程度不高,说明 ZnPc 在纳米粒子内具有良好的单分散性。DPBF 是一种 $^1\text{O}_2$ 探针分子,其与 $^1\text{O}_2$ 发生氧化反应而导致其在 410 nm 的吸收峰值降低^[25]。

ZnPc 纳米粒子与 DPBF 混合后的吸收光谱随 660 nm 光辐照时间的变化如图 2(b)所示。由图中可以看出,ZnPc 的吸收率基本保持稳定,而 DPBF 在 410 nm 处的吸收峰强度则随辐照时间而

明显降低,如图 2(b)中插图所示。这说明纳米光敏剂中 ZnPc 包埋于疏松透气纳米基质中,氧气(或 $^1\text{O}_2$)分子可自由进出,保证了 $^1\text{O}_2$ 的有效产生。

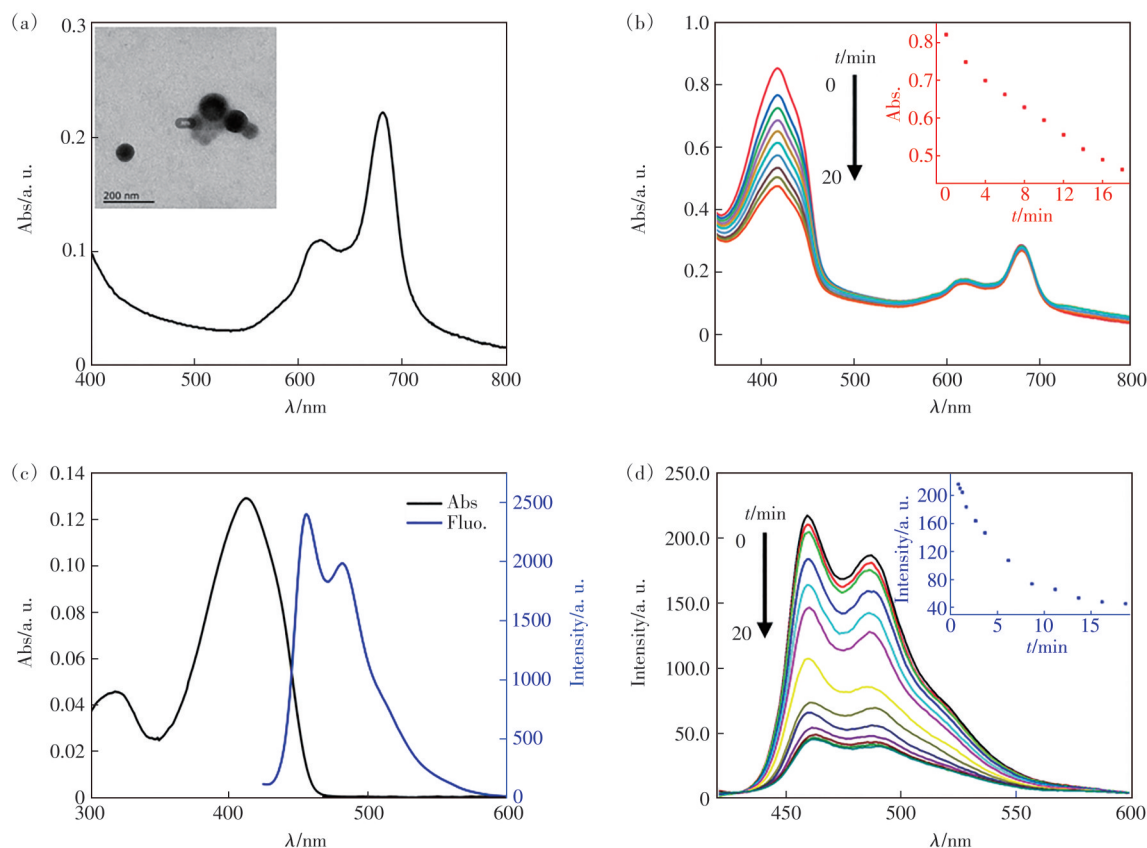


图2 ZnPc 纳米粒子:(a)UV-Vis吸收光谱,其中插图为纳米粒子的TEM照片;(b)与DPBF混合溶液的吸收光谱(660 nm光辐照,0~20 min)及其410 nm吸收率随辐射时间的变化(插图)。DPBF 纳米粒子:(c)UV-Vis吸收和荧光发射光谱($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$);(d)与ZnPc 纳米粒子混合溶液的荧光发射光谱($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$)(660 nm光辐照,0~20 min)及其460 nm荧光强度随辐射时间的变化(插图)

Fig.2 ZnPc NPs: (a)UV-Vis absorption spectrum with the inset of TEM image; (b)absorption spectra of DPBF mixed solution (660 nm light irradiation, 0~20 min), the variation of 410 nm absorption rate with radiation time (illustration). DPBF NPs: (c)UV-Vis absorption spectrum and fluorescence emission spectrum ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$); (d)fluorescence emission spectra of mixed solution with ZnPc NPs (660 nm light irradiation, 0~20 min), the variation of fluorescence intensity at 460 nm with radiation time (illustration)

鉴于 DPBF 分子具有荧光性能,且荧光传感具有更高的灵敏度,同样利用共沉淀-包覆法制备了掺杂 DPBF 的纳米粒子进行 $^1\text{O}_2$ 荧光传感。其吸收光谱与荧光光谱如图 2(c)所示,可以看到 DPBF 纳米粒子的吸收峰位于~410 nm 处,与 DPBF 分子的吸收峰位置基本一致。在 410 nm 光激发下,DPBF 纳米粒子发射出峰值~460 nm 蓝色荧光。将 ZnPc 纳米粒子与 DPBF 纳米粒子混合,其荧光发射光谱与 660 nm 光辐照时间的关系如图 2(d)所示。由图 2(d)中插图可以清晰地看到,

460 nm 荧光发射强度随着光照时间逐渐下降,证明了 $^1\text{O}_2$ 分子可扩散进入纳米粒子内并猝灭 DPBF 的发光,即 DPBF 纳米粒子可以作为 $^1\text{O}_2$ 荧光探针。需要指出,460 nm 荧光强度随着光照时间的衰减是非线性的,这可能是因为纳米粒子内 DPBF 分子被漂白的数量与 $^1\text{O}_2$ 扩散半径(由外向内)的三次方成正比。

利用微流控芯片培养Hela细胞,用共聚焦显微镜对两种纳米粒子的吞噬效果进行研究。图 3(a)、(b)分别是正常培养在微流控芯片中的Hela细胞

在吞噬纳米粒子前后的明场成像。可以观察到Hela细胞在培养室的表面可以贴壁生长,形态良好;负载纳米粒子后的细胞形貌基本没有发生变化,说明ZnPc纳米粒子具有良好的生物兼容性。图3(c)是细胞明场照片与638~680 nm激发光下红色荧光照片的叠加图像,可以清楚地观察到ZnPc的红色荧光(发射波长为675 nm)与细胞重合,说明细胞可高效吞噬ZnPc纳米粒子。

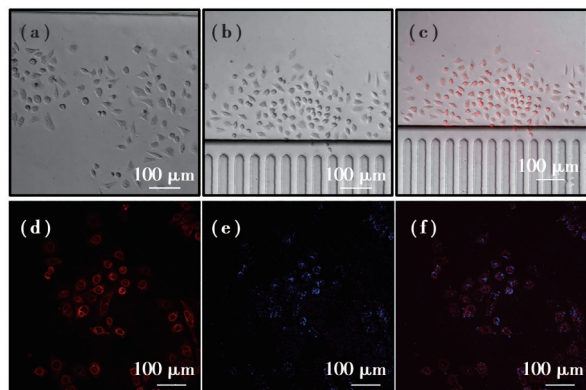


图3 微流控芯片培养室内未吞噬(a)和吞噬ZnPc纳米粒子的(b)的Hela细胞的明场照片,以及与其共聚焦荧光图像($\lambda_{\text{ex}} = 638 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 665 \sim 705 \text{ nm}$)的叠加图(c)。同时吞噬ZnPc和DPBF纳米粒子的Hela细胞共聚焦荧光照片:(d) $\lambda_{\text{ex}} = 638 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 665 \sim 705 \text{ nm}$; (e) $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 440 \sim 500 \text{ nm}$; (f)图像叠加

Fig.3 Bright field photos of HeLa cells in the microfluidic chip culture chamber without phagocytosis (a) and phagocytosis of ZnPc NPs (b). (c) Superposition of bright field and confocal fluorescence images ($\lambda_{\text{ex}} = 638 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 665 \sim 705 \text{ nm}$) of phagocytosis of ZnPc nanosensitizer HeLa cells. Confocal fluorescence images of HeLa cells simultaneously engulfing two types of nanoparticles: (d) ZnPc NPs ($\lambda_{\text{ex}} = 638 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 665 \sim 705 \text{ nm}$); (e) DPB NPs ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 440 \sim 500 \text{ nm}$); (f) image overlay

将Hela细胞与ZnPc纳米粒子及DPBF纳米粒子共孵育,其荧光成像照片如图3(d)~(f)所示。从图中可以看到两种纳米粒子的荧光分布位置基本一致,说明大部分肿瘤细胞可同时吞噬ZnPc和DPBF纳米粒子。考虑到 $^1\text{O}_2$ 的短寿命(约10~100 ns)和短的扩散半径(~10 nm),两种纳米粒子在细胞内的共定位可以保证对PDT产生 $^1\text{O}_2$ 的实时、快速响应,为后续PDT实验奠定了良好的基础。

最后利用微流控芯片对PDT给药方案进行筛选,不同给药方案的活死染色荧光图像与细胞

存活率如图S2所示,筛选结果见补充文件。在本研究中,12 $\mu\text{g/mL}$ 的给药剂量和1 min的辐照时间可以产生低于60%的细胞存活率,据此开展了后续PDT的研究。

3.3 微流控芯片PDT中单线态氧的荧光传感与分析

类比于肿瘤微环境对PDT的影响,利用微流控生物芯片研究微酸化和力学微环境对PDT疗效的影响。

基于此前的实验,此处光辐照采用660 nm激光(10 mW/cm^2),辐照时间1 min;ZnPc纳米粒子给药剂量为12 $\mu\text{g/mL}$ (pH=7.4, 7.1, 6.8),分别采用5, 10, 20 $\mu\text{L/h}$ 的流量。图4为PDT作用后的肿瘤细胞活死染色荧光照片。可以看到,三种低注射流量下活死细胞(绿红色细胞)数目比值差异不大,但其大致与流量成反比。而对于pH而言,pH为7.1时死亡细胞(红色)的数目最多,而不是随酸化程度增加单调减少。上述实验结果一方面说明肿瘤微环境的确影响肿瘤细胞对光敏药物的摄取,进而影响PDT疗效;另一方面也可能存在肿瘤微环境对 $^1\text{O}_2$ 产生效率的影响,这会复杂化肿瘤细胞的PDT疗效。后者无法单纯靠细胞活死染进行判断,如能对PDT过程中 $^1\text{O}_2$ 的产生进行检测,显然可以更准确地分析肿瘤微环境对PDT功效的影响。为了准确分析肿瘤微环境对PDT功效的影响,同时也为了分析微环境参量对 $^1\text{O}_2$ 产率的影响,在微流控芯片PDT中进行 $^1\text{O}_2$ 的荧光传感

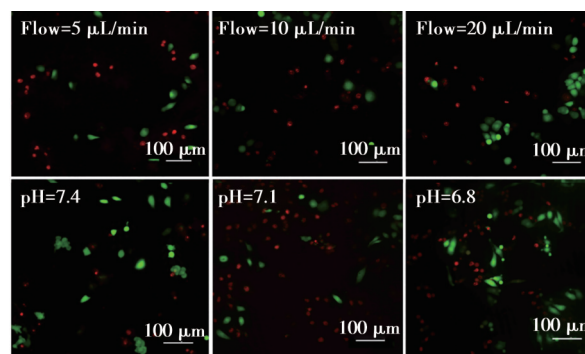


图4 不同注射流量(上)和pH值(下)对Hela细胞PDT疗效的影响。绿色荧光 $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, 采集范围500~550 nm;红色荧光 $\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$, 采集范围581~654 nm

Fig.4 The effect of different injection flow rates (upper) and pH values (lower) on the therapeutic effect of HeLa cell PDT. Green fluorescence: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, collection scope 500~550 nm. Red fluorescence: $\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$, collection scope 581~654 nm

与分析实验。首先基于静态培养细胞开展了DPBF纳米粒子对PDT过程中 $^1\text{O}_2$ 荧光传感的实验(图5(a))。如图所示,PDT组中DPBF纳米粒子的蓝色荧光随着光辐照急剧减弱,直至消失;而对照组中DPBF的荧光强度则缓慢下降(荧光漂白)。显然,光辐照下肿瘤细胞内ZnPc纳米粒子产生大量 $^1\text{O}_2$,其迅速氧化胞内的DPBF纳米粒子,从而导致其荧光衰减。

最后利用微流控芯片对酸化、力学微环境进行调控,同时进行PDT,并基于DPBF纳米粒子对 $^1\text{O}_2$ 进行荧光传感分析。将时间序列图像的灰度绘制成曲线,图5(b)~(d)分别是标准情况、不同pH值、不同注入流量下DPBF纳米粒子的荧光衰减曲线。从图中可以观察到,对照组的荧光强度随时间缓慢下降,300 s后下降大约10%,这显然应归因于405 nm激发光的荧光漂白。PDT过

程中DPBF纳米粒子的荧光衰减在不同条件下具有相似的行为,即荧光强度均随着敏化光的开启而迅速衰减(120~150 s)。这意味着虽然肿瘤细胞在不同条件下的光敏剂吞噬量可能有差异,但由于PDT开始阶段氧含量水平较高,产生的 $^1\text{O}_2$ 数量大而具有相似的光毒性。之后随着PDT的持续进行(150~300 s),氧含量水平降低,DPBF纳米粒子荧光的衰减速率也逐渐变缓,但因实验条件不同而略有差异。对于酸化参量而言(图5(c)),pH为6.8时DPBF的荧光衰减速率最快,这显然与其纳米光敏剂的吞噬量最小相矛盾(图5(a))。可能的原因是 $^1\text{O}_2$ 在低pH下寿命更长,因而扩散半径变大,光毒性增强,这需要更深入的研究。对于注射流量而言(图5(d)),三种流量下DPBF的荧光衰减速率差异不大,仅20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 相对衰减更快。这可能是因为大流量提供了相对高水平的氧

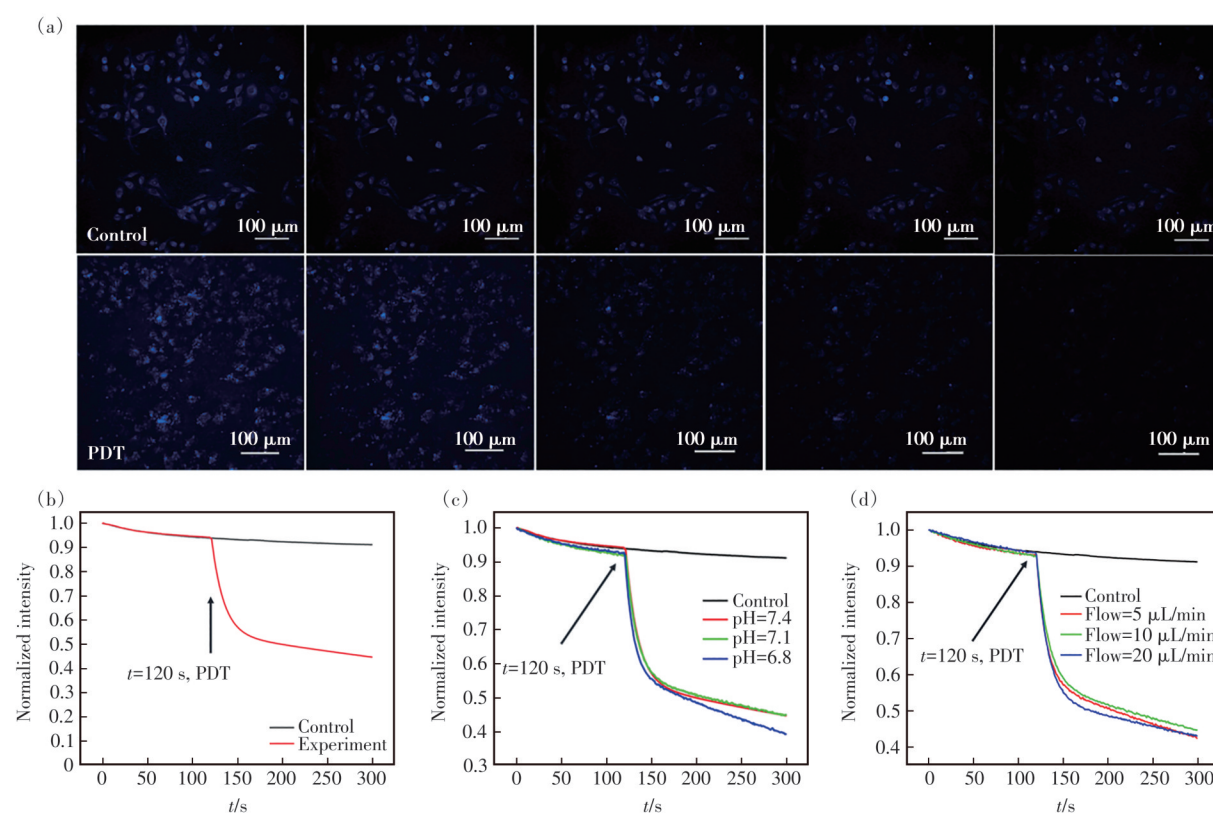


图5 (a)负载DPBF纳米粒子的Hela细胞在PDT作用下的荧光图像(不同辐照时间节点,从左到右分别为0,1,2,3,4 min):(上)对照组,无ZnPc纳米粒子;(下)PDT实验组。激发波长405 nm,采集范围440~500 nm。(b)Hela细胞中DPBF纳米粒子的荧光随时间衰减曲线。不同pH值下(c)与不同注入流量下(d)Hela细胞中DPBF纳米粒子的荧光衰减曲线,箭头所示120 s处为660 nm光辐照开始时间

Fig.5 (a) Fluorescence imaging of HeLa cells loaded with DPBF NPs under PDT treatment (Different irradiation time nodes, from left to right, are 0, 1, 2, 3, 4 min): (Above) Control group, without ZnPc nano photosensitizer; (Below) PDT experimental group. $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, collection scope 440~500 nm. (b) The fluorescence decay curve of DPBF NPs in HeLa cells over time. Fluorescence attenuation curves of DPBF NPs in HeLa cells at different pH values (c) and injection flow rates (d). As indicated by the arrow, at $t=120 \text{ s}$, the 660 nm laser commences irradiation

含量,因而产生更多的 $^1\text{O}_2$ 。

4 结 论

本文制备了ZnPc纳米光敏剂与DPBF单线态氧荧光纳米传感器,并设计制作微流控生物芯片,基于此开展了微流控芯片上的PDT研究。结果表明,肿瘤细胞对ZnPc纳米粒子的吞噬效率随着环境酸化以及剪切应力的增加而单调减弱,但是PDT功效与微环境参量的关系则较为复杂。在PDT初期,较高水平的氧含量可产生大量 $^1\text{O}_2$,微酸化和力学微环境的差异对光毒性影响不大,在30 s内荧光强度均下降40%左右;PDT后期氧含量下降, $^1\text{O}_2$ 产率下降,且因肿瘤微环境参量的不同而产生不同的光毒性。该工作提供了一种模拟

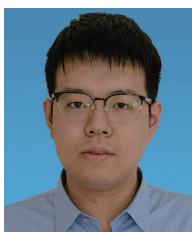
人体肿瘤微环境的工具与思路,为推进PDT在癌症治疗方面的发展提供了有益的参考。需要指出的是,本论文仅讨论了微酸化和剪切应力对PDT的影响,而肿瘤微环境作为一个复杂系统还存在其他关键参量。例如,肿瘤乏氧通过限制氧气供给而降低 $^1\text{O}_2$ 的产生,微环境中过表达的谷胱甘肽会消耗光敏化产生的活性氧,这些都会导致PDT肿瘤治疗效果不佳。因此,在后续工作中,我们将基于微流控芯片继续肿瘤微环境模拟的研究,进一步完善实体肿瘤PDT方案的筛选。

本文补充文件和专家审稿意见及作者回复内容的下载地址:<http://cjl.lightpublishing.cn/thesisDetails#10.37188/CJL.20240145>.

参 考 文 献:

- [1] FENG R M, SU Q L, HUANG X Y, *et al.* Cancer situation in China: what does the China cancer map indicate from the first national death survey to the latest cancer registration? [J]. *Cancer Commun.*, 2023, 43(1): 75-86.
- [2] SOUSSAIN C, RICARD D, FIKE J R, *et al.* CNS complications of radiotherapy and chemotherapy [J]. *Lancet*, 2009, 374(9701): 1639-1651.
- [3] LI G, WU M M, XU Y X, *et al.* Recent progress in the development of singlet oxygen carriers for enhanced photodynamic therapy [J]. *Coord. Chem. Rev.*, 2023, 478: 214979.
- [4] VOURA E B, JAISWAL J K, MATTOUSSI H, *et al.* Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy [J]. *Nat. Med.*, 2004, 10(9): 993-998.
- [5] IDETA R, TASAKA F, JANG W D, *et al.* Nanotechnology-based photodynamic therapy for neovascular disease using a supramolecular nanocarrier loaded with a dendritic photosensitizer [J]. *Nano Lett.*, 2005, 5(12): 2426-2431.
- [6] HUANG Y Y, SHARMA S K, DAI T H, *et al.* Can nanotechnology potentiate photodynamic therapy? [J]. *Nanotechnol. Rev.*, 2012, 1(2): 111-146.
- [7] ZHOU T J, XING L, FAN Y T, *et al.* Inhibition of breast cancer proliferation and metastasis by strengthening host immunity with a prolonged oxygen-generating phototherapy hydrogel [J]. *J. Control. Release*, 2019, 309: 82-93.
- [8] 涂港, 凌丹萍, 刘杰. 用作近红外光引导的化学-光热协同治疗的上转换-铋纳米诊疗剂 [J]. *发光学报*, 2022, 43(7): 1040-1051.
TU G, LING D P, LIU J, *et al.* Upconversion-bismuth nanosystem as theranostic agent for NIR laser-driven chemo-photothermal therapy [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2022, 43(7): 1040-1051. (in Chinese)
- [9] IDRIS N M, JAYAKUMAR M K G, BANSAL A, *et al.* Upconversion nanoparticles as versatile light nanotransducers for photoactivation applications [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44(6): 1449-1478.
- [10] 孔庆超, 孙文悦, 林金莹, 等. 基于卟啉-金属有机框架材料的光动力疗法研究进展 [J]. *发光学报*, 2023, 44(8): 1505-1519.
KONG Q C, SUN W Y, LIN J Y, *et al.* Research progress of photodynamic therapy based on porphyrin-metal organic framework materials [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2023, 44(8): 1505-1519. (in Chinese)
- [11] LU K D, HE C B, GUO N N, *et al.* Chlorin-based nanoscale metal-organic framework systemically rejects colorectal cancers *via* synergistic photodynamic therapy and checkpoint blockade immunotherapy [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, 138(38): 12502-12510.
- [12] LI X S, LOVELL J F, YOON J, *et al.* Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer [J]. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2020, 17(11): 657-674.

- [13] JO Y, CHOI N, KIM K, *et al.* Chemoresistance of cancer cells; requirements of tumor microenvironment-mimicking *in vitro* models in anti-cancer drug development [J]. *Theranostics*, 2018, 8(19): 5259-5275.
- [14] 李子洋, 李煜赫, 李慧珺, 等. 微流控技术制备荧光纳米材料研究进展 [J]. 发光学报, 2022, 43(10): 1524-1541.
LI Z Y, LI X H, LI H J, *et al.* Research progress in preparation of fluorescent nanomaterials by microfluidic technique [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2022, 43(10): 1524-1541. (in Chinese)
- [15] XU Z Y, LI E C, GUO Z, *et al.* Design and construction of a multi-organ microfluidic chip mimicking the *in vivo* microenvironment of lung cancer metastasis [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, 8(39): 25840-25847.
- [16] NASHIMOTO Y, OKADA R, HANADA S, *et al.* Vascularized cancer on a chip: the effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid [J]. *Biomaterials*, 2020, 229: 119547.
- [17] LOU X, KIM G, YOON H K, *et al.* A high-throughput photodynamic therapy screening platform with on-chip control of multiple microenvironmental factors [J]. *Lab Chip*, 2014, 14(5): 892-901.
- [18] CHEN M B, HAJAL C, BENJAMIN D C, *et al.* Inflamed neutrophils sequestered at entrapped tumor cells *via* chemotactic confinement promote tumor cell extravasation [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2018, 115(27): 7022-7027.
- [19] WIMALACHANDRA D C, LI Y, LIU J L, *et al.* Microfluidic-based immunomodulation of immune cells using upconversion nanoparticles in simulated blood vessel-tumor system [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, 11(41): 37513-37523.
- [20] DONG J H, UEDA H. ELISA-type assays of trace biomarkers using microfluidic methods [J]. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2017, 9(5): e1457.
- [21] WEI T, WILLMARTH W W. Reynolds-number effects on the structure of a turbulent channel flow [J]. *J. Fluid Mech.*, 1989, 204: 57-95.
- [22] ZHU L, LAUGA E, BRANDT L. Low-Reynolds-number swimming in a capillary tube [J]. *J. Fluid Mech.*, 2013, 726: 285-311.
- [23] LUO T K, NASH G T, XU Z W, *et al.* Nanoscale metal-organic framework confines zinc-phthalocyanine photosensitizers for enhanced photodynamic therapy [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, 143(34): 13519-13524.
- [24] PING J T, PENG H S, DUAN W B, *et al.* Synthesis and optimization of ZnPc-loaded biocompatible nanoparticles for efficient photodynamic therapy [J]. *J. Mater. Chem. B*, 2016, 4(25): 4482-4489.
- [25] ENTRADAS T, WALDRON S, VOLK M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments [J]. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2020, 204: 111787.



孙煜然(1998-),男,山东烟台人,硕士研究生,2020年于苏州大学获得学士学位,主要从事微流控芯片在肿瘤光动力治疗中应用的研究。
E-mail: 21302269@muc.edu.cn



彭洪尚(1975-),男,山东临沂人,博士,教授,2007年于北京交通大学获得博士学位,主要从事发光量子点和荧光纳米传感器的研究。
E-mail: hshpeng@bjtu.edu.cn