

文章编号: 1000-7032(2024)11-1889-15

动力学效应诱导的近红外光响应温和光热治疗

罗嘉民¹, 张亚茹¹, 谭美玲¹, 田秀梅^{2*}, 侯智尧^{1*}

(1. 广州医科大学 基础医学院, 广东 广州 511436;

2. 广州医科大学 生物医学工程学院, 广东 广州 511436)

摘要: 癌症是世界上高致死率的疾病之一, 传统治疗方法如化疗、放疗和手术等由于其局限性而常常使疗效不尽如人意。光热疗法(Photothermal therapy, PTT)是基于光热治疗剂的光热转换效应, 将近红外光能量转换为热能并杀死癌细胞。然而, PTT消融肿瘤所需的温度较高, 通常会引起周围正常组织/器官的损伤。采用较低治疗温度(38~43 °C)的温和光热治疗(Mild photothermal therapy, mPTT)对于推动PTT进入肿瘤临床治疗具有重要意义。但是, 即便小幅度的温度升高也会使癌细胞处于热应激状态并使热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)表达上调, 影响mPTT对癌细胞的杀伤效果。为了改善mPTT的治疗效果, 本研究以树枝状孔硅包覆稀土荧光纳米晶的纳米复合材料(DCNP@DMSN)作为基质材料, 在其表面上修饰MnFe₂O₄纳米酶并在孔道内装载吲哚菁绿(ICG), 设计了一种近红外荧光成像引导和动力学效应诱导的近红外光(NIR)响应mPTT协同治疗体系。该体系呈现出肿瘤微环境响应的化学动力学效应和近红外光激发的光动力学效应, 产生的活性氧物质及脂质过氧化物可下调低温光热处理产生的热应激性HSP70的表达, 实现动力学效应诱导的mPTT, 在4T1乳腺癌中显示出良好的抗肿瘤性能。同时, 该平台具备近红外二区荧光成像功能, 可实现对活体肿瘤的定位。这对开发多功能诊疗一体化纳米平台, 实现治疗过程的可视化、个体化以及精准化, 改善肿瘤治疗效果具有重要意义。

关键词: 光热治疗; 光动力治疗; 纳米酶; 近红外荧光成像; 热休克蛋白

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20240202

Dynamic Effect Induced Near-infrared Light Responsive Mild Photothermal Therapy

LUO Jiamin¹, ZHANG Yaru¹, TAN Meiling¹, TIAN Xiumei^{2*}, HOU Zhiyao^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;

2. School of Biomedical Engineering, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

* Corresponding Authors, E-mail: tianxiumei224@163.com; zyhou@gzhmu.edu.cn

Abstract: Cancer is one of the most lethal diseases globally. Traditional treatment modalities like chemotherapy, radiotherapy, and surgery often fall short due to their limitations. Photothermal therapy (PTT), which utilizes the photothermal conversion effect of photothermal therapy agents (PTAs) to convert near-infrared energy into heat for cancer cell destruction, typically requires high temperatures that can damage adjacent normal tissues/organs. Mild photothermal therapy (mPTT) with a lower treatment temperature range (38–43 °C) is crucial for advancing PTT in tumor clinical treatment. However, even a minor temperature increase can induce heat stress in cancer cells and up-regulate the expression of heat shock proteins (HSPs), affecting mPTT's efficacy. To enhance mPTT's therapeutic effect, in this study, a near-infrared (NIR) fluorescence imaging-mediated and kinetic effect-induced NIR-responsive

收稿日期: 2024-08-29; 修订日期: 2024-09-11

基金项目: 广东省教育厅普通高校重点领域专项(2020ZDZX2020); 国家自然科学基金(52072082, 32101143, 52302086, 52372078); 广东省基础与应用基础研究基金(2023A151010299); 广州医科大学附属第六医院、清远市人民医院开放研究基金(202011-105)

Supported by Key Scientific Research Project of Guangdong Provincial Department of Education (2020ZDZX2020); National Natural Science Foundation of China (52072082, 32101143, 52302086, 52372078); Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2023A151010299); the Open Research Funds from the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital (202011-105)

mPTT synergistic therapeutic system was designed using dendritic mesoporous silica-coated rare earth fluorescent nanocrystal nanocomposites (DCNP@DMSN) as the matrix material, modified with MnFe_2O_4 nano-enzymes on the surface and loaded with indocyanine green (ICG) in the pore channels. DDMFI displays tumor microenvironment-responsive chemical kinetic effects and NIR-activated photodynamic effects. The generated reactive oxygen species and lipid peroxides can downregulate the expression of heat stress-induced HSP70 from low-temperature photothermal treatment, enabling kinetic effect-induced mPTT. In a 4T1 breast cancer model, it shows promising anti-tumor performance. Additionally, the platform has near-infrared second region fluorescence imaging functionality for *in vivo* tumor localization. Collectively, this approach holds great significance for the development of multifunctional integrated nano-platforms.

Key words: photothermal therapy; photodynamic therapy; nanozyme; near infrared imaging; heat shock protein

1 引 言

癌症已成为严重威胁人民群众健康的重大公共卫生问题之一^[1]。传统的癌症治疗方式存在一定的弊端或局限性而无法获得令人满意的治疗效果。光热治疗(PTT)是一种利用纳米光热治疗剂吸收近红外光的能量并转换为热能,在局部肿瘤区域高温消融病灶的策略^[2]。然而,PTT通常需要将肿瘤组织局部温度升高至 50 °C 以上,如此高的温度不仅会消融肿瘤,同样会对肿瘤组织周围的正常组织造成损伤^[3]。为了减轻 PTT 的副作用,研究者们开始使用低温光热疗法(mPTT)($<45\text{ °C}$)去诱导癌细胞死亡^[4-5]。然而,由于光热条件下癌细胞能激活其自我保护路径,如提高热休克蛋白(HSPs)的表达快速修复低热造成的细胞损害,使得 mPTT 的治疗效果不够理想。研究发现,脂质过氧化物(LPO)和活性氧物质(ROS,包括过氧化氢 H_2O_2 、羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 、超氧阴离子 $\cdot\text{O}^{2-}$)可以清除 HSPs^[6-9]。一方面,ROS 可以与蛋白质发生反应形成交联物,从而破坏其结构和功能。另一方面,ROS 可以攻击细胞膜中的不饱和脂肪酸链(PUFAs),形成大量有害的 LPO, LPO 自发形成醛降解产物,使蛋白质的伯胺交联,进一步破坏蛋白质的结构和功能^[10-11]。因此,调节胞内 ROS 应激水平有望降低癌细胞的热耐受性,提升 mPTT 疗效。

动力学治疗是利用胞内产生的大量 ROS 来诱导癌细胞凋亡,包括基于光敏剂的光动力治疗(Photodynamic therapy, PDT)和基于纳米酶的化学动力学治疗(Chemodynamic therapy, CDT)。PDT 利用光敏剂分子在特定波长的光照下产生的 ROS 杀死癌细胞^[12]。吲哚菁绿(ICG)早在 1954 年被美国食品药品监督管理局批准作为造影剂进行临床应用。ICG 在近红外光激发下产生 ROS 并呈现优异

的光动力效应。但是, ICG 存在浓度依赖性聚集、半衰期短、光稳定性差、水解稳定性差、与蛋白质非特异性结合、非特异性靶向等局限性,限制了其在肿瘤治疗中的进一步应用,将 ICG 整合到纳米平台中是克服这些限制的一种有效策略^[13-14]。CDT 是基于过渡金属纳米材料发生芬顿或类芬顿反应,催化分解肿瘤微环境(TME)中过表达的内源性 H_2O_2 生成细胞毒性的 $\cdot\text{OH}$ 诱导癌细胞死亡^[15]。且 PTT 与 PDT、CDT 联合使用,可诱导潜在的协同治疗效果。一方面,动力学效应诱导的 ROS 消耗 HSPs 过程可实现 PTT 对肿瘤的抑制。另一方面, PTT 产生的热量能够通过改善局部血流和增加肿瘤组织内氧气浓度来提升 ROS 产率,提升动力学治疗的疗效^[16]。因此,开发基于 PDT/CDT 的动力学治疗体系对于改善 mPTT 疗效十分重要。近年来,纳米酶作为一种具有酶催化活性的纳米材料,其特有的多功能催化活性使其能够在肿瘤微环境中特异性地催化产生细胞毒性分子,被广泛应用于 ROS 介导的肿瘤治疗。纳米酶能够催化酶的底物,具备类似天然酶的催化效率以及酶促反应动力学。并且拥有天然酶所不具备的优点,如高稳定性、成本低、外部刺激(如光照、超声、热、磁场)可控制的催化行为。其中,基于可变价金属离子(如 $\text{Fe}^{2+/3+}$ 、 $\text{Cu}^{1+/2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+/4+}$)催化反应构建的纳米酶可有效调节肿瘤微环境并提高抗肿瘤治疗效果^[17-20]。林君等制备了基于 Cu_2MoS_4 纳米酶的多功能级联生物反应器,在近红外生物窗口具有强吸收, 1 064 nm 激光激发下可产生显著的 PTT 和动力学治疗效果^[20]。此外,开发多功能诊疗一体化纳米平台对实现治疗过程的可视化、个体化以及精准化具有重要意义^[21]。荧光成像具备反馈快、辐射无害、灵敏度高、成本低等特点,受

到了生物医学研究领域的广泛关注^[22]。相较于常规的可见区(400~700 nm)荧光成像,处于近红外生物窗口(700~1 700 nm)的NIR荧光成像由于组织散射、吸收和自发荧光较低,以及高信背比(SBR),更适合进行体内光学成像^[23]。NIR造影剂包括有机小分子和共聚物等有机荧光探针,以及镧系纳米晶体等无机荧光探针。镧系纳米晶体具有不同的发射波长、延长发光寿命、非光漂白活性和高生物相容性等优点,近年来被广泛应用于生物医学成像领域^[24-25]。

为了将PTT、PDT、CDT和NIR成像等整合在一个体系中,需要构建纳米复合结构。介孔二氧化硅纳米颗粒(MSN)由于其高比表面积和孔容积、优良的生物相容性、易于表面修饰和功能化被广泛运用于药物传递系统^[26]。然而,MSN仅限负载小分子药物(分子尺寸小于2 nm)。一些被认为是潜在的诊断或者治疗疾病的候选者,如大分子(分子尺寸大于5 nm)或者无机纳米粒子(直径在5~30 nm),则难以负载到MSN中。树枝状介孔硅纳米粒子(DMSN)相比MSN具有大的且可调的孔径(10~40 nm)和更大的比表面积,被认为是可

行的纳米药物载体^[27]。本研究以树枝状介孔硅包覆稀土荧光纳米晶的纳米复合材料(DCNP@DMSN)作为基质材料(简称为DD),在其表面上修饰 MnFe_2O_4 纳米酶和孔道内装载ICG,设计了一种近红外荧光成像介导和PDT/CDT诱导的近红外光(NIR)响应mPTT协同治疗体系(DCNP@DMSN@ MnFe_2O_4 -ICG,简称为DDMFI)(图1)。该体系具有基于 MnFe_2O_4 纳米酶的CDT和基于ICG的PDT双重动力学效应:(1) MnFe_2O_4 通过类过氧化物酶(POD)活性分解TME中过表达的 H_2O_2 产生 $\cdot\text{OH}$;(2)ICG在808 nm激光激发下能够生成 $^1\text{O}_2$, MnFe_2O_4 通过类过氧化氢酶(CAT)活性产生 O_2 ,解决TME缺氧的环境并提升ICG的光动力性能。DMSN为 MnFe_2O_4 和ICG提供负载位点, MnFe_2O_4 和ICG在808 nm近红外激发下呈现光热效应并进一步促进动力学过程,产生的ROS及LPO可下调低温光热处理产生的热应激性HSP70的表达,通过裂解HSPs来消除癌细胞耐热性保护,实现动力学效应诱导的mPTT,并显示出良好的抗肿瘤性能;同时,DDMFI具备近红外二区荧光成像功能,可实现对活体肿瘤的定位。

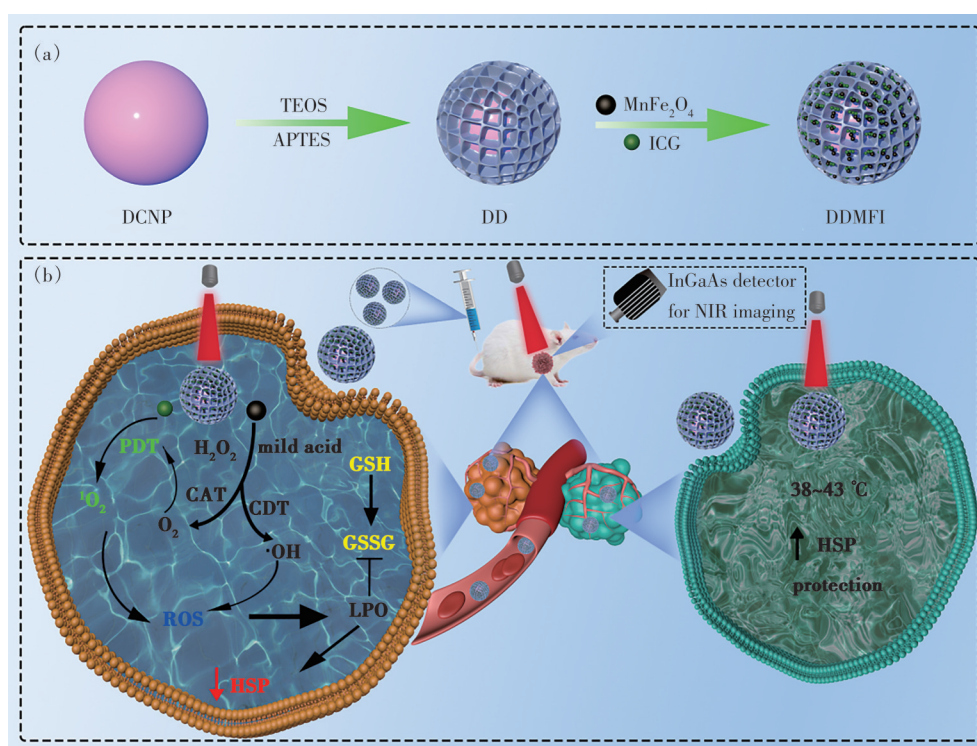


图1 (a)DDMFI合成步骤示意图;(b)近红外光和肿瘤微环境响应的DDMFI实现动力学效应诱导的温和光热治疗以及近红外二区荧光成像

Fig.1 (a)Scheme of DDMFI synthetic procedures. (b)Near-infrared light and tumor microenvironment responded DDMFI realizes kinetic effect-induced mild photothermal therapy and NIR- II fluorescence imaging

2 实 验

2.1 样品制备

Y-OA 前驱体 ($0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的制备: 向三颈烧瓶中加入 2 mmol 的 $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、4 mL OA (oleic acid, 油酸)、6 mL ODE (1-octadecene, 十八烯), 氮气保护下加热至 150°C , 保持 60 min 随后降温至室温得到 Y-OA 前驱体溶液。

类似地制备了 Yb-OA 前驱体 ($0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 Nd-OA 前驱体 ($0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

Na-TFA-OA 前驱体 ($0.80 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的制备: 向三颈烧瓶中加入 8 mmol 的 Na-TFA (sodium trifluoroacetate, 三氟乙酸钠)、10 mL OA, 室温下搅拌 3 h 后得到 Na-TFA-OA 前驱体溶液。

NaErF_4 核纳米晶的制备: 向三颈烧瓶中加入 1 mmol $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、6 mL OA、15 mL ODE, 加热至 120°C 抽真空保持 1 h 除去水和氧气, 随后氮气保护下加热至 160°C , 保持 30 min 获得均一的黄色透明溶液后降温至室温。加入 0.148 g NH_4F 和 0.1 g NaOH 的 10 mL 甲醇溶液并搅拌 30 min, 升温至 70°C 保持 30 min 除去甲醇, 抽真空升温至 110°C 除去水, 通入氮气升温至 300°C 保持 1 h 后降温至室温。加入过量无水乙醇离心获取沉淀 ($8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), NaErF_4 核纳米晶体经过环己烷和无水乙醇洗涤 3 次后分散在 10 mL 环己烷中保存。

$\text{NaErF}_4@ \text{NaYF}_4: 30\% \text{Yb}$ 纳米晶的制备: 向三颈烧瓶中加入 5 mL NaErF_4 核纳米晶、8 mL OA、12 mL ODE, 除去环己烷和水后升温至 300°C , 0.7 mL 的 Y-OA、0.3 mL 的 Yb-OA、0.5 mL 的 Na-TFA-OA 前驱体在 15 min 的间隔内交替注入。五次循环注入后, 反应溶液再维持 15 min, 冷却至室温。加入过量无水乙醇离心获取沉淀 ($8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), $\text{NaErF}_4@ \text{NaYF}_4: 30\% \text{Yb}$ 核纳米晶经过环己烷和无水乙醇洗涤 3 次后分散在 10 mL 环己烷中保存。

$\text{NaErF}_4@ \text{NaYF}_4: 30\% \text{Yb} @ \text{NaYF}_4: 20\% \text{Nd}$ 纳米晶的制备: 将前驱体换成 0.8 mL 的 Y-OA、0.2 mL 的 Nd-OA 和 0.5 mL Na-TFA-OA 前驱体, 以相同的方法制备了 $\text{NaErF}_4@ \text{NaYF}_4: 30\% \text{Yb} @ \text{NaYF}_4: 20\% \text{Nd}$ 核壳纳米晶 (简称为 DCNP)。

DCNP@DMSN 的制备: 向圆底烧瓶中加入 1.0 g CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)、0.3 g 尿素、20 mL 超纯

水、0.5 mL 正丁醇超声和搅拌获得澄清透明溶液。另取一只离心管, 加入 10 mL 环己烷、0.8 mL 的 DCNP 纳米晶溶液、0.775 mL TEOS (tetraethyl orthosilicate, 正硅酸乙酯), 混匀后滴加入圆底烧瓶, 搅拌 1 h 后升温至 70°C , 15 h 后离心 ($12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min) 获得沉淀。重新分散在 50 mL 乙醇, 加入 0.6 g 硝酸铵, 70°C 加热回流 12 h, 离心获取沉淀重复洗涤 3 次, 重复 3 次萃取 CTAB 后在 50°C 烘箱过夜烘干。

DD- NH_2 的制备: 向圆底烧瓶中加入 30 mg 的 DCNP@DMSN、10 mL 无水乙醇、120 μL APTES, 室温搅拌 3 h 后离心, 用无水乙醇洗涤 3 次获得 DD- NH_2 。

MnFe_2O_4 纳米晶体的制备: 向三颈烧瓶中加入 1 mmol 的乙酰丙酮锰、2 mmol 的乙酰丙酮铁、20 mL OM, 氮气氛围下 110°C 搅拌 30 min。然后, 升温至 300°C , 1 h 后冷却至室温, 加入过量无水乙醇离心沉淀 ($8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 丙酮洗涤 3 次后分散在氯仿中。取 0.05 g 柠檬酸、0.5 g BMPA (2-bromoisobutyric acid, 2-溴异丁酸) 和 20 mg MnFe_2O_4 纳米晶溶解在 14 mL 氯仿和 DMF 的混合液体中 (比例 1:1), 混合液体搅拌 12 h, 通过离心获得 BMPA- MnFe_2O_4 并分散在无水乙醇中。

DDMF 的制备: 100 mg 氨基修饰的 DCNP@DMSN 加入 20 mL 的 BMPA- MnFe_2O_4 溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 中并在室温下搅拌 12 h, 离心获得 DD-MF, 并分散在去离子水中。将合成的 10 mg DDMF 分散在 Me-PEG₂₀₀₀-Silane 乙醇溶液中 (100 mL , $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 然后在 60°C 下磁力搅拌 24 h。然后, 离心收集并用乙醇和去离子水反复清洗, 最后分散在去离子水中, 获得 DCNP@DMSN@ MnFe_2O_4 , 简称为 DDMF。

DDMFI 的制备: 向上述 PDDMF 溶液中加入 400 μL ICG 溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 室温下搅拌 12 h 后离心取上清液测量 UV 吸光度, 然后沉淀通过冻干收集, 获得 DDMFI。

2.2 样品表征

透射电镜采用日本电子公司的 JEM-1400PLUS 测定。粒径和电位采用马尔文公司的 Zetasizer 测定。X 射线衍射结果采用日本理学公司的 smartLab 9 kW 测定。傅里叶变换红外光谱采用赛默飞公司的 Nicolet iS50 测试。紫外可见近红外吸收光谱采用岛津公司的 UV-3600Plus 测

定。孔径与比表面积结果采用贝诗德仪器的 BSD-PS(M) 测量。使用热成像仪测试纳米复合材料的光热性能。光热转换效率 η 通过以下公式计算: $\eta = [hS(T_{\max} - T_{\text{surr}}) - Q_{\text{dis}}] / I(1 - (10)^{-A_{\lambda}})$ 。其中, h 为系统的热转换效率, S 为比色皿的面积, $T_{\max}$ 为样品溶液的平衡温度, T_{surr} 为样品周围环境温度, I 为 808 nm 连续激光器的功率密度, A_{λ} 为 DDMFI 溶液在 $\lambda = 808$ nm 处的吸光度。此外, Q_{dis} 表示由于容器本身的光吸收而造成的热损失, $Q_{\text{dis}} = (5.4 \times 10^{-4})$ 。为了计算 hS , 引入另一个公式 $hS = (mC_{\text{water}}) / \tau_s$ 。其中, m 为样品质量, C_{water} 为水的比热容, $C_{\text{water}} = 4.2 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, τ_s 是样品系统时间常数。为了验证 DDMFI 生成 $^1\text{O}_2$ 的能力, 使用 DPBF 作为探针检测 $^1\text{O}_2$, 检测不同生成 $^1\text{O}_2$ 的速率。检测不同条件下 DDMFI 生成 $^1\text{O}_2$ 的能力, 分为 PBS 组、乏氧组、乏氧 + H_2O_2 组、正常氧组、正常氧 + H_2O_2 组。在黑暗环境中配置好 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPBF 探针溶液。对于乏氧组, 确认手套箱的密封性良好, 并通过抽真空和通入氮气创造一个无氧的环境。在手套箱中, 将 2 mL 含有 DPBF 的乙醇溶液与 2 mL 的 pH 为 6.5, 含有 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DDMFI 的 PBS 溶液混合, 在黑暗环境下磁力搅拌并使用 808 nm 的近红外激光照射, 照射不同时间, 激光功率为 $1.0 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。使用 UV-3600 Plus 测量吸收谱。

2.3 细胞和动物实验

小鼠成纤维细胞(L929)采用 DMEM 完全培养基(由 DMEM 培养基 + 10% 体积的胎牛血清 + 100 U/mL 的青霉素和链霉素构成), 小鼠乳腺癌细胞(4T1)采用 1640 完全培养基(由 1640 培养基 + 10% 体积的胎牛血清 + 100 U/mL 的青霉素和链霉素构成), 两种细胞均放置于恒温恒湿(37°C , 5% CO_2)的培养箱中孵育。Calcein-AM /PI 染色(Beyotime, C2015L)、细胞内 ROS 水平(DCFH-DA probe, Beyotime, S0033S)、细胞内 LPO 水平(Liperfluo probe, Dojindo, L248)、线粒体膜电位检测(Beyotime C2015S)等实验均按照相应说明书进行实验。

将 100×10^4 个 4T1 乳腺癌细胞注射到 BALB/c 雌性小鼠左侧的乳腺脂肪垫中构建鼠源原位乳腺癌模型, 待小鼠肿瘤体积约 100 mm^3 时, 将所有小鼠随机分为 6 组(PBS 组、NIR 组、DDMF 组、DDMFI 组、DDMF+NIR 组、DDMFI+NIR 组), 每组 5 只

小鼠。分别在植瘤后第 6 天和第 8 天瘤内注射 DDMF 或 DDMFI 溶液($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 对照组小鼠给予同等剂量的 PBS。使用 808 nm 激光照射肿瘤部位($0.4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$, 10 min)。在治疗过程中, 每隔两天用游标卡尺测量肿瘤组织的直径, 并按照如下公式计算小鼠肿瘤的体积: $V = 0.5 \times a \times b^2$, 其中 a 为肿瘤长边的直径, b 为肿瘤短边的直径, 单位为 mm。为了探究 NIR 光照下不同治疗组中小鼠肿瘤温度上升情况, 同时使用红外热像仪记录 10 min 内肿瘤温度上升情况和肿瘤部位光热效应。所有动物实验均遵循《实验动物的护理和使用指南》的规定进行, 且获得广州医科大学动物护理和使用委员会的批准(批准编号: 2021069), 并符合所有相关的伦理法规。

3 结果与讨论

3.1 材料合成与表征

首先通过高温热分解法合成了稀土下转换纳米晶体 DCNP。在无水无氧的条件下, 合成了 NaErF_4 纳米晶, 如图 2(a) 所示, 合成的 NaErF_4 纳米晶形貌均一且分散性良好, 平均粒径为 $(14.2 \pm 0.2) \text{ nm}$ 。然后, 通过高温连续注射法每隔 15 min 注射一次壳层稀土前驱体溶液, 在 NaErF_4 纳米晶表面包覆一层 $\text{NaYF}_4: 30\% \text{Yb}$ 外壳(图 2(b))。 $\text{NaErF}_4@ \text{NaErF}_4: 30\% \text{Yb}$ 核壳纳米晶依然呈现均一的形貌和良好的分散性, 平均粒径为 $(19.7 \pm 0.1) \text{ nm}$ 。为了使得纳米晶体能敏化吸收 808 nm 近红外光, 我们继续在 $\text{NaErF}_4@ \text{NaErF}_4: 30\% \text{Yb}$ 核壳纳米晶表面生长了一层含 Nd 的壳层 $\text{NaErF}_4: 20\% \text{Nd}$ 。如图 2(c) 所示, DCNP 核壳纳米晶平均粒径为 $(29.3 \pm 0.2) \text{ nm}$, 图 2(d) 为核壳纳米晶的高分辨透射电镜照片, 可以看到清晰的晶格条纹, 证明核壳纳米晶具有良好的结晶性。图 2(e) 为 DCNP 核壳纳米晶的 XRD, 主要衍射峰如 17.271° (100)、 30.063° (110)、 30.807° (101)、 43.560° (201)、 53.784° (211) 和 $\beta\text{-NaErF}_4$ 的 XRD 标准卡片对应, 证明了合成的核纳米晶相对纯粹的晶相。包覆 DMSN 的 DD 的 TEM 照片如图 2(f) 所示, 可以看到树枝状的硅层生长在下转换稀土纳米晶表面。DD 的形貌均一, 分散性良好, 平均粒径为 140 nm, 硅层的厚度约为 100 nm。XRD 谱图(图 2(g))进一步证实了 DCNP@DMSN 纳米复合材料的形成, 主要衍射峰如 17.271° (100)、 30.063° (110)、 30.807° (101)、 43.560° (201)、

53.784°(211)来自于DCNP, 2θ 在20°~30°处的非晶性宽化衍射峰与DMSN对应,表明DMSN成功地包覆在下转移稀土纳米晶表面。通过高温热分解方法合成油酸稳定的 MnFe_2O_4 纳米晶,并采用TEM、HR-TEM以及XRD方法进行表征。图2(h)为锰铁氧纳米晶(MnFe_2O_4)的透射电镜

照片,高分辨透射电镜照片(插图)表明 MnFe_2O_4 的晶格条纹,且尺寸在10 nm以下。 MnFe_2O_4 的XRD结果衍射图(图2(i))说明其衍射峰与 MnFe_2O_4 标准卡片(JCPDS10-0319)相符,证实了所合成 MnFe_2O_4 纳米晶的纯相以及其对应的晶体结构。

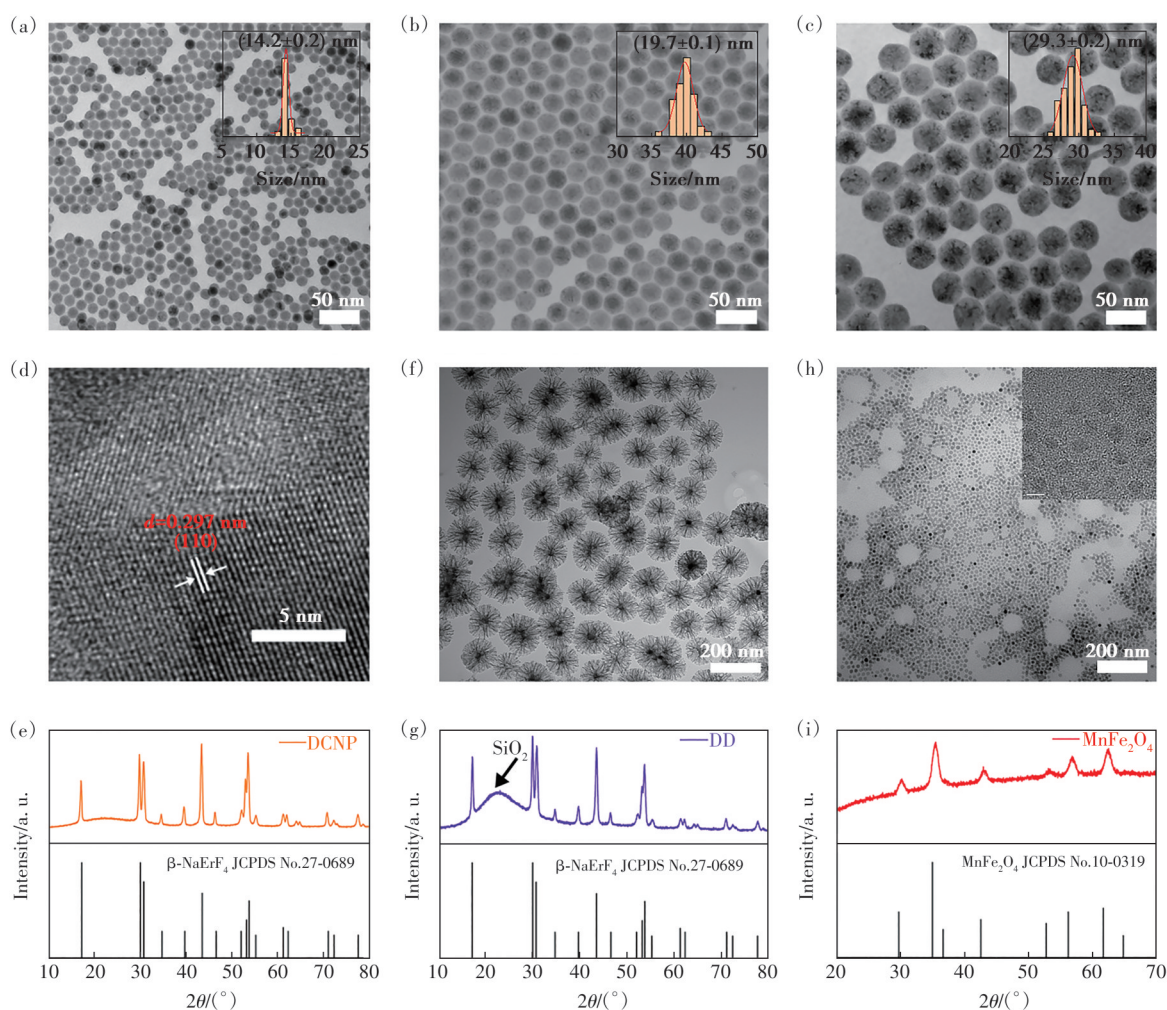


图2 NaErF_4 (a)、 $\text{NaErF}_4\text{:NaYF}_4\text{:30\%Yb}$ (b)、DCNP(c)的TEM照片,插图为粒径分布;(d)DCNP的HR-TEM照片;(e)DCNP的XRD谱图;(f)DCNP@DMSN的TEM照片;(g)DCNP@DMSN的XRD谱图;(h) MnFe_2O_4 的TEM照片,插图为 MnFe_2O_4 的HR-TEM照片,标尺为5 nm;(i) MnFe_2O_4 的XRD谱图

Fig.2 TEM and corresponding particle size distribution of NaErF_4 (a), $\text{NaErF}_4\text{:NaYF}_4\text{:30\%Yb}$ (b) and DCNP(c). (d)HR-TEM of DCNP. (e) The XRD patterns of DCNP. (f) TEM of DCNP@DMSN. (g) The XRD patterns of DCNP@DMSN. (h)TEM of MnFe_2O_4 . The inserted picture is HR-TEM of MnFe_2O_4 and the scale bar is 5 nm. (i)The XRD patterns of MnFe_2O_4

接下来,我们利用APTES水解在DD表面修饰氨基后,与表面修饰BMPA的 MnFe_2O_4 进行键合,并加入光敏剂ICG,通过静电作用吸附合成纳米复合材料DDMFI。DDMFI的TEM照片如图3(a)所示,可以看到 MnFe_2O_4 成功地连接在DD的表面和孔洞内。采用XRD分析合成产物DDMF的结

构(图3(b)),其中DD的主要衍射峰30.063°(101)、43.560°(201)、53.784°(211)和 MnFe_2O_4 的主要衍射峰29.705°(220)、34.980°(311)、56.195°(511)、61.656°(440)同时存在,证明了DDMF的成功复合。进一步地测试了DDMFI的能量色散X射线光谱(EDS)(图3(c)),结果表明

了DDMF中各种元素的种类、分布及大致含量。我们通过测试纳米复合材料的电位变化来说明材料的修饰过程。如图3(d)所示,修饰了BMPA的 MnFe_2O_4 纳米晶的表面电位为负,表明BMPA成功地修饰在 MnFe_2O_4 表面。DD的表面电位为负,修饰APTES后表明电位变正,说明氨基成功地被引入到DD的表面。DD- NH_2 表面依次键合 MnFe_2O_4 和负载ICG之后,表面电位下降,证明DDMFI已成功复合。另外,如图3(e)所示,与peg、ICG和DDMF相比,peg修饰后的peg-DDMFI

的FTIR光谱出现了C—H伸缩振动区、C=N伸缩振动区以及S=O伸缩振动区,进一步证实了DDMF成功修饰peg和负载ICG。DD和DDMF的氮气吸附曲线如图3(f)所示,DD具有高比表面积($447.6728\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)和较大孔容积($1.6206\text{ cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$),有利于进行表面修饰和药物分子的负载。此外,连接 MnFe_2O_4 纳米酶后,DDMF的比表面积($293.4308\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)和孔容积($0.9214\text{ cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$)均明显地减小,证明 MnFe_2O_4 成功地修饰在DD的表面和孔道中。

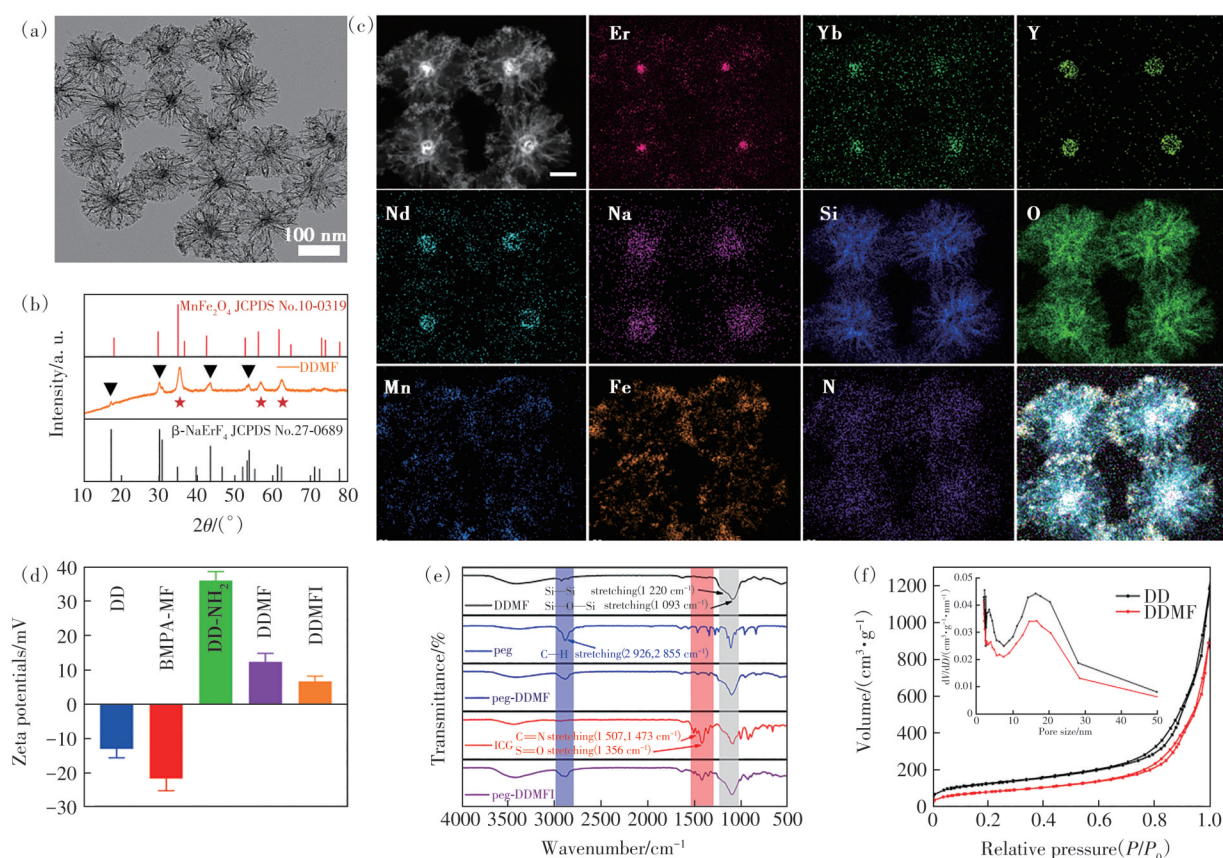


图3 (a)DDMFI的TEM照片;(b)DDMF的XRD图谱;(c)DDMFI的能量色散X射线光谱,标尺为50 nm;(d)DD、BMPA-MF、DD- NH_2 、DDMF、DDMFI的Zeta电位;(e)peg、ICG、DDMF、peg-DDMF、peg-DDMFI的FT-IR光谱;(f)DD和DDMF的BET氮气吸附脱附曲线,插图为孔径分布图

Fig.3 (a)TEM of DDMFI. (b)XRD patterns of DDMF. (c)EDS of DDMFI and the scale bar is 50 nm. (d)Zeta potential of DD, BMPA-MF, DD- NH_2 , DDMF, DDMFI. (e)Fourier transform infrared spectrometer(FT-IR) of peg, ICG, DDMF, peg-DDMF, peg-DDMFI. (f)The BET nitrogen adsorption-desorption curves of DD and DDMF. The inset is the pore size distribution diagram

3.2 光热性能及模拟酶活性分析

我们检测了DDMFI的紫外可见近红外吸收光谱(图4(a)),结果表明,DD、MF、ICG在808 nm均有吸收,复合后的DDMFI在808 nm同样有吸收。随后,检测了在功率密度为 $1.0\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的808 nm激光照射下,不同浓度($0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,

$0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的DDMFI水分散液的温度变化曲线(图4(b)),升温呈现浓度依赖关系。同样地,检测了浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 下,不同功率密度($0.3\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, $0.5\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, $0.8\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, $1.0\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, $1.2\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$)的DDMFI水分散液的温度变化曲线(图4(c)),升温呈现功率密度依赖关系。为了达

到低温光热治疗的目的,我们选择DDMFI浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和激光功率密度为 $1\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。如图4(d)所示,在浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和功率为 $1\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 条件下,DDMF和DDMFI的光热转换效率分别为18.54%和33.12%,表明ICG的负载显著提高了

材料的光热性能。且相比于同类材料,DDMFI的光热转换效率与同类材料相当^[28-30]。如图4(e)所示,DDMFI在808 nm激光照射下经过4次升降温过程中光热效果变差,这与ICG的光热稳定性直接相关。

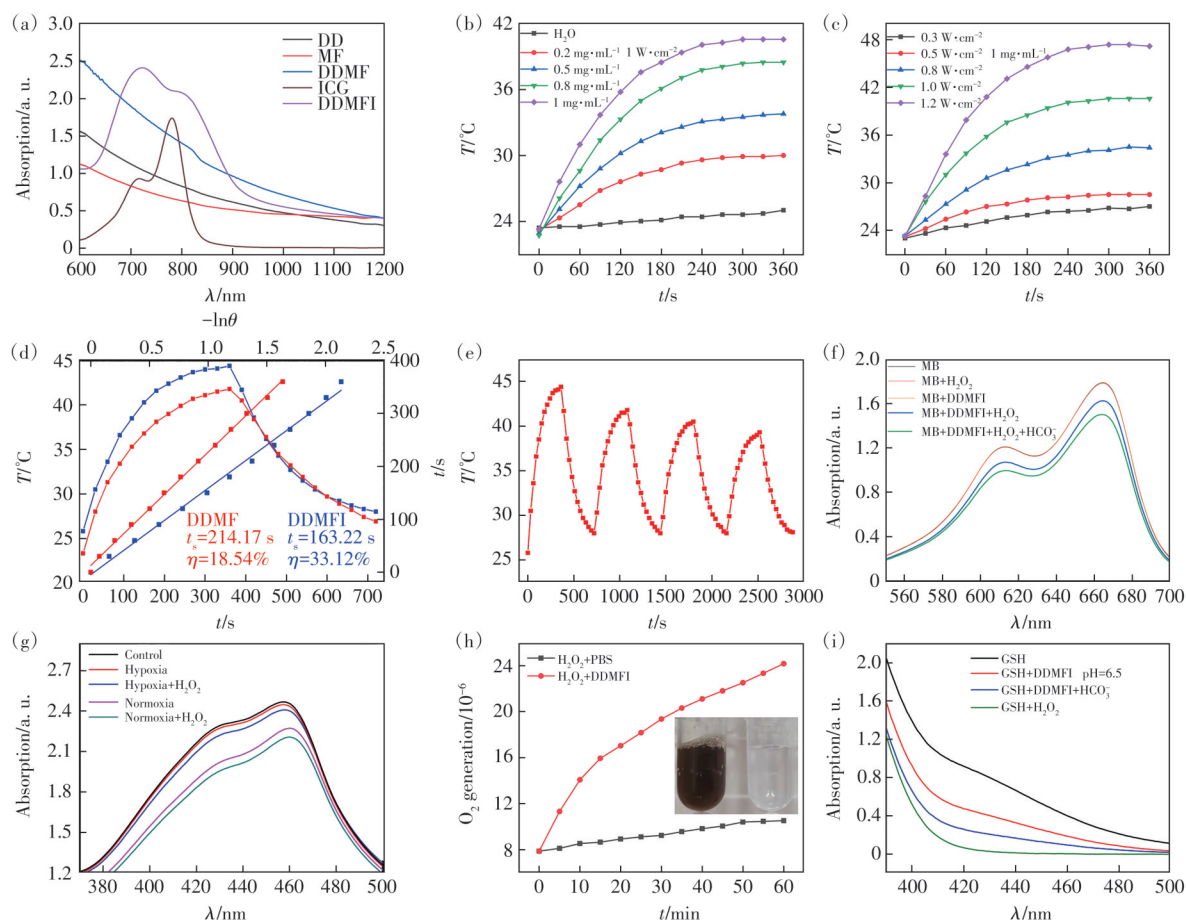


图4 (a)DD、MF、DDMF、ICG、DDMFI的紫外可见近红外吸收光谱;(b)808 nm激光器激发下不同浓度DDMFI的光热转换曲线(体积为1 mL,功率为 $1\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$);(c)808 nm激光器激发下不同功率密度DDMFI的光热转换曲线(体积为1 mL,浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$);(d)808 nm激光器激发下360 s内DDMF和DDMFI的升温曲线(功率密度为 $1\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$,浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),随后关闭激光器室温冷却360 s内的降温曲线;(e)808 nm激光器激发下重复4个开关循环的温度曲线;(f)DDMFI的MB降解实验;(g)DDMFI分解 H_2O_2 生成 O_2 ,插图为生成 O_2 的数码照片;(h)DDMFI生成 $^1\text{O}_2$ 消耗DPBF;(i)DDMFI降解GSH减少TNB的生成

Fig.4 (a)UV/Vis-NIR absorption of DD, MF, DDMF, ICG and DDMFI. (b)Photothermal conversion curves of DDMFI(1 mL, $1\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) with different concentrations under 808 nm laser. (c)Photothermal conversion curves of DDMFI(1 mL, $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) under different power densities of 808 nm laser. (d) Temperature curves of DDMF and DDMFI under 808 nm laser (360 s, $1\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), followed by turn off laser and ambient cooling within 360 s. (e)Temperature curves of DDMFI under 808 nm laser with repeating of 4 on-off cycles. (f)MB degeneration study of DDMFI. (g) O_2 generation from H_2O_2 decomposition by DDMFI and the inserted picture is oxygen generation digital picture. (h)Depletion of DPBF due to $^1\text{O}_2$ generation by DDMFI. (i)TNB decline owing to GSH consumption after treatment with DDMFI

随后,依次检测了DDMFI在体外溶液层面的不同催化性质以及光动力学效应,包括类过氧化物酶活性(POD, $\cdot\text{OH}$ 的生成)、类过氧化氢酶活性(CAT, O_2 生成)、类谷胱甘肽氧化物酶性质

(GSHO_x,GSH消耗)、DPBF降解(PDT, $^1\text{O}_2$ 生成)。图4(f)通过亚甲基蓝(MB)降解实验检测了 $\cdot\text{OH}$ 的生成,在没有DDMFI的组中(MB组和MB+ H_2O_2),MB的吸收没有变化表明双氧水没有产生

·OH。材料组加入 H_2O_2 后, 溶液中 MB 的浓度开始下降, 这是由于 DDMFI 通过 POD 酶活性产生的 ·OH 降解了 MB 造成的。在富含 CO_2 的环境中, H^+ 和 HCO_3^- 存在的条件下, 体系 pH 值的下降增强了 POD 酶活性, 促进了 MB 的降解。采用便携式溶解氧仪检测 DDMFI 在 H_2O_2 过表达的环境中生成氧气的情况, 从图 4(g) 可以看到 PBS 组氧气浓度水平基本没有变化, 从插图中也看不到有气泡生成, DDMFI 组因为 CAT 酶活性而生成了大量氧气, 插图显示了气泡大量生成。接下来, 我们检测 DDMFI 在有外源光照情况下的光动力学性能, 采用 DPBF 作为探针检测体系中的 $^1\text{O}_2$ 。可以看到 PBS 组和近红外激光光照组 DPBF 的吸收基本没有差别 (图 4(h)), 表明单纯的近红外激光光照对 $^1\text{O}_2$ 的含量基本没有影响。在加入了 DDMFI 以及 808 nm 激光照射后, DPBF 吸收峰出现了下降, 表明了体系中 $^1\text{O}_2$ 的生成。另外, 在乏氧水平下 PDT 过程中 $^1\text{O}_2$ 的生成量比在正常氧气水平下少, 这说明 PDT 疗法呈现氧气依赖性, 而 DDMFI 所具有的 CAT 酶活性可以解决肿瘤微环境中乏氧的问题, 从而提升 PDT 效果。虽然 DDMFI 在 TME 条件下和 NIR 激发下呈现化学动力和光动力学效应, 但 TME 中过表达的 GSH 会消耗动力学过程在癌细胞中产生的 ROS, 不仅会降低 ROS 介导的动力学治疗效果, 同时也会影响 ROS 对于热应激 HSPs 蛋白的消耗。最后, 我们证实 DDMFI 的 GSHOx 酶活性, 采用 DTNB 作为探针检测 GSH 在 412 nm (TNB) 处吸光度值的变化。如图 4(i) 所示, PBS 组的 TNB 含量高于其他组, 表明未被氧化的 GSH 最多。GSH+ H_2O_2 组作为阳性对照, 在强氧化条件下还原性 GSH 会被氧化为氧化谷胱甘肽 (GSSG), 可以看到酸性条件下 DDMFI 组 GSH 的含量明显低于 PBS 组, 说明了 DDMFI 在微酸环境下的 GSH 消耗能力。因此, DDMFI 可以模拟 GSHOx 显著清除高表达的 GSH, 通过破坏癌细胞抗氧化防御系统, 使动力学过程中产生的 ROS 得到充分利用。综上所述, DDMFI 具有 GSHOx 和 POD 模拟酶活性, 可以通过级联反应催化 GSH 消耗和 ·OH 生成, 同时 CAT 模拟酶活性产生 O_2 来提高 PDT 过程中 $^1\text{O}_2$ 的产生能力, 从而为充分利用体系 ROS 沉默 HSPs 蛋白提供有效策略。

3.3 材料的细胞光毒性测试

为了检测纳米材料在体外的生物相容性, 我

们将不同浓度的 DDMFI 与小鼠成纤维细胞 L929 共培养 24 h, 随后使用经典的 MTT 法测量细胞活性。如图 5(a) 所示, 在浓度依次为 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DDMFI 共孵育下, 细胞活性均高于 90%, 表明我们合成的 DDMFI 具有良好的体外生物相容性。肿瘤微环境区别于正常生理环境 (如微酸、乏氧、GSH 过表达), 使得纳米药物在肿瘤治疗过程中与正常细胞表现出不同的毒性。因此, 我们将不同浓度的 DDMFI 与小鼠乳腺癌细胞 4T1 共培养 24 h, 通过 MTT 实验测量细胞活性。结果表明, 随着 DDMFI 的浓度的提高, 4T1 细胞的活性受到了抑制, 在浓度为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞死亡了大约 36%, 这表明 DDMFI 的化学动力学治疗可以杀死部分癌细胞 (图 5(b))。进一步地, 我们采用 808 nm 近红外激光辐照 ($1.0\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) 细胞并使温度达到 42 $^{\circ}\text{C}$, 考察 mPTT/CDT/PDT 协同治疗对 4T1 细胞的抑制效果 (图 5(c))。细胞贴壁后, 加入不同浓度的 DDMFI 共孵育 4 h, 待细胞摄取。808 nm 近红外激光辐照后, 再放入培养箱孵育 12 h, 然后测量细胞活性。MTT 结果表明, 808 nm 近红外激光辐照下, 在浓度为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞的死亡率上升至 72%, 表明 mPTT/CDT/PDT 协同作用明显提升了 NIR 激活 DDMFI 的治疗效果。为了更直观地反映 DDMFI 对癌细胞的抑制作用, 我们将不同浓度 (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 DDMFI 与小鼠乳腺癌细胞 4T1 共培养 4 h, 808 nm 近红外激光辐照 ($1.0\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) 治疗。采用 Calcein-AM/PI 对细胞染色, Calcein-AM 仅对活细胞染色 (绿色), PI 仅能穿过死细胞膜和细胞 DNA 结合而呈现红色荧光。采用蔡司荧光倒置显微镜进行观察, 如图 5(d) 所示, 单独的 808 nm 近红外激光辐照 ($1.0\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) 基本没有造成 4T1 细胞死亡, 这表明不存在光热治疗剂的情况下, 所使用的激光功率计量是安全的。对于 DDMF 和 DDMFI 组, 非光辐照下的化学动力学治疗仅仅能杀死少数 4T1 细胞, 大部分的细胞仍然保持正常的细胞膜功能, 而单独 ICG 处理 4T1 细胞并不会造成细胞的损伤。在 808 nm 激光光辐照下, 治疗温度保持在 42 $^{\circ}\text{C}$, DDMF 组呈现 CDT 和 mPTT 的协同作用, 4T1 细胞的杀伤效果相较于单独的 CDT 有所提升。ICG+NIR 组则呈现 PDT 和 mPTT 的协同作用, 对 4T1 细胞具有明显的抑制作用。DDMFI 在

有 808 nm 激光辐照时对 4T1 细胞的杀伤效果显著提升,在与 ROS 相关的 CDT/PDT 诱导下,mPTT

可以在较低的治疗温度对癌细胞产生良好的抑制作用。

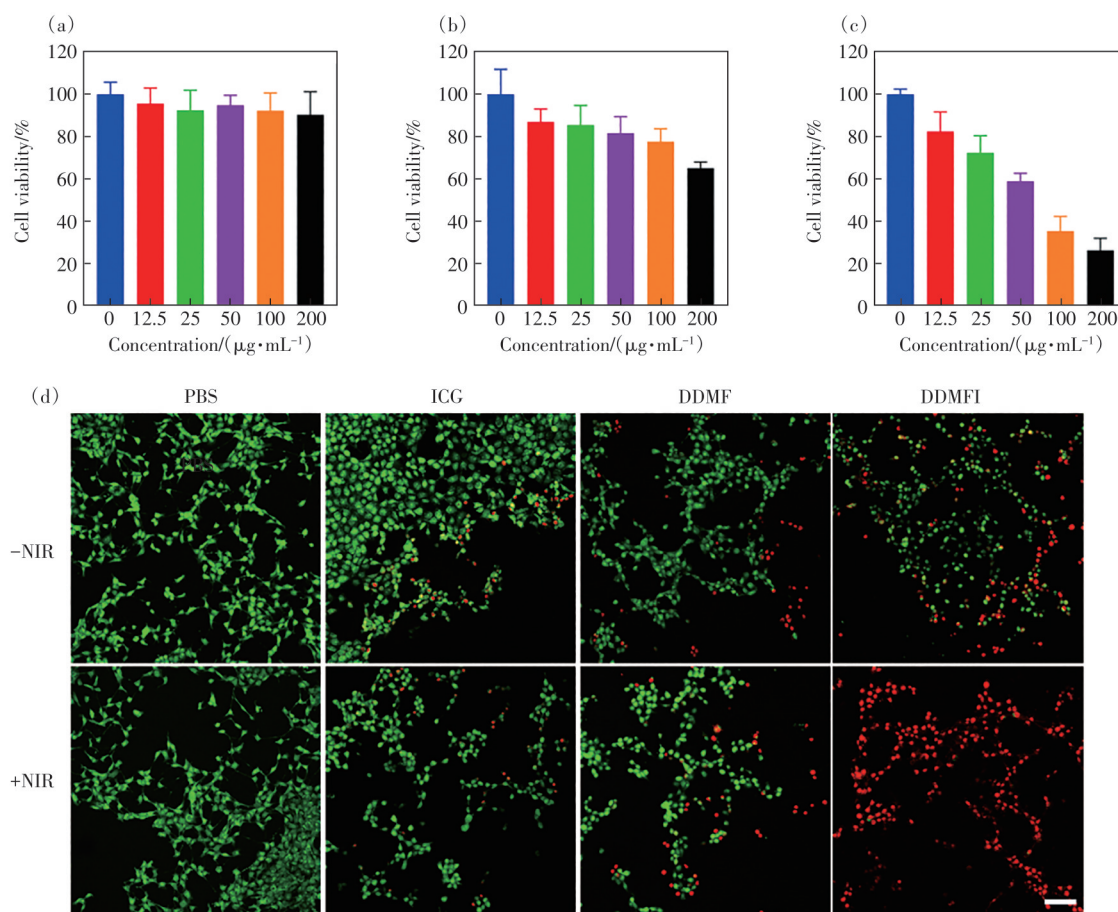


图5 (a)不同浓度的DDMFI与小鼠成纤维细胞L929共孵育24 h后MTT实验;(b)不同浓度的DDMFI与小鼠乳腺癌细胞4T1共孵育24 h后MTT实验;(c)808 nm激光器激发下不同浓度的DDMFI与小鼠乳腺癌细胞4T1共孵育后MTT实验;(d)不同组经过Calcein-AM/PI染色处理后荧光倒置显微镜拍摄图片,标尺为100 μm

Fig.5 (a) MTT assay for different concentrations of DDMFI treatment with L929 in 24 h. (b) MTT assay for different concentrations of DDMFI treatment with 4T1 in 24 h. (c) MTT assay for different concentrations of DDMFI treatment with 4T1 under 808 nm laser. (d) Pictures of different groups after treatment with Calcein-AM/PI detected by inverted fluorescence microscope, scale bar is 100 μm

3.4 材料光毒性的作用机制

DDMFI具有 NIR 激发 PDT 和 TME 响应 CDT 的动力学效应,因此我们使用 DCFH-DA 对细胞内 ROS 水平进行了检测。当有活性氧存在时,DCFH-DA 被氧化为能产生明亮绿色荧光的二氯荧光黄(DCF)。如图 6(a)所示,PBS 组以及 ICG 组没有检测到绿色荧光。单纯的 ICG 组由于 $^1\text{O}_2$ 的生成产生了绿色荧光,DDMF 组在有无辐照的情况下均由于 CDT 效应产生的 $\cdot\text{OH}$ 检测到绿色荧光。值得注意的是,DDMFI+NIR 组的荧光最强,这是由于除了 DDMFI 的 CDT 效应生成的 $\cdot\text{OH}$ 增强了荧光强度,DDMFI 的 CAT 酶活性缓解了肿瘤微环境的乏氧状况,增强了 ICG 的 PDT 效应,实

现了 1+1>2 的效果。线粒体功能对于癌细胞生存至关重要,因此我们采用 JC-1 染色对近红外光诱导的 DDMFI 诱发 4T1 细胞线粒体的损伤进行了研究,利用流式细胞技术分析了线粒体膜电位的极化趋势(由红/绿荧光强度比率变化来显示)。如图 6(b)所示,PBS 组以及 ICG 组的红绿荧光强度比率差别不大。DDMF 组、DDMFI 组、DDMF+NIR 组的 CDT 效应产生的 $\cdot\text{OH}$ 以及 ICG+NIR 的 PDT 效应产生的 $^1\text{O}_2$ 加大了极化程度。DDMFI+NIR 组的 CAT/CDT/PDT 协同效应产生的大量的 $\cdot\text{OH}$ 和 $^1\text{O}_2$ 造成线粒体的极化程度更深。DDMFI 一方面能在 808 nm 近红外辐照下生成 ROS,另一方面能够消耗 GSH。因此,我们采用 Liperfluo 对

细胞内的 LPO 进行染色。当有 LPO 存在时, Liperfluo 会被 LPO 特异性氧化, 因此能对 LPO 进行荧光标记(绿色)。如图 6(c)所示, PBS 组和 ICG 组无绿色荧光。ICG+NIR 组、DDMF 组和 DDMFI 组的绿色荧光强度与 PBS 组相比提高, 这表明 ROS 的积累促进了 LPO 水平的提高。DDMFI+NIR 组的绿色荧光强度相较于其他实验组大大增强, 这表明 CAT/CDT/PTT 共同积累的 ROS 显著提升了细胞内 LPO 水平。ROS 和 LPO 均能清除 HSPs, 对于 HSPs 水平的检测能够反映 mPTT 的治疗效果。HSP70 是 HSP 家族中主要的 HSP 之一, 我们采用蛋白质免疫印迹法(WB)检测 4T1 细胞中 HSP70

的表达水平。如图 6(d)所示, 单纯的铁死亡抑制剂组(Fer)相较于对照组表达没有变化。辐照组由于温度的升高 HSP70 表达最多。DDMFI 组由于 GSH 消耗和 LPO 的积累相较于对照组略微下调了 HSP70 表达。DDMFI+NIR 组相较于 NIR 组 HSP70 表达下调。Fer 可以抑制 ROS 和 LPO 在细胞中的作用, DDMFI+NIR+Fer 组 HSP70 表达比 DDMFI+NIR 组提高, 但仍然比 NIR 组低。这表明 NIR 辐照和 TME 响应的 DDMFI 促进了 ROS 的产生和 LPO 的积累, 可以有效清除 mPTT 过程中因细胞温度升高而过表达的 HSP70, 实现了 mPTT/CDT/PDT 协同治疗效果。

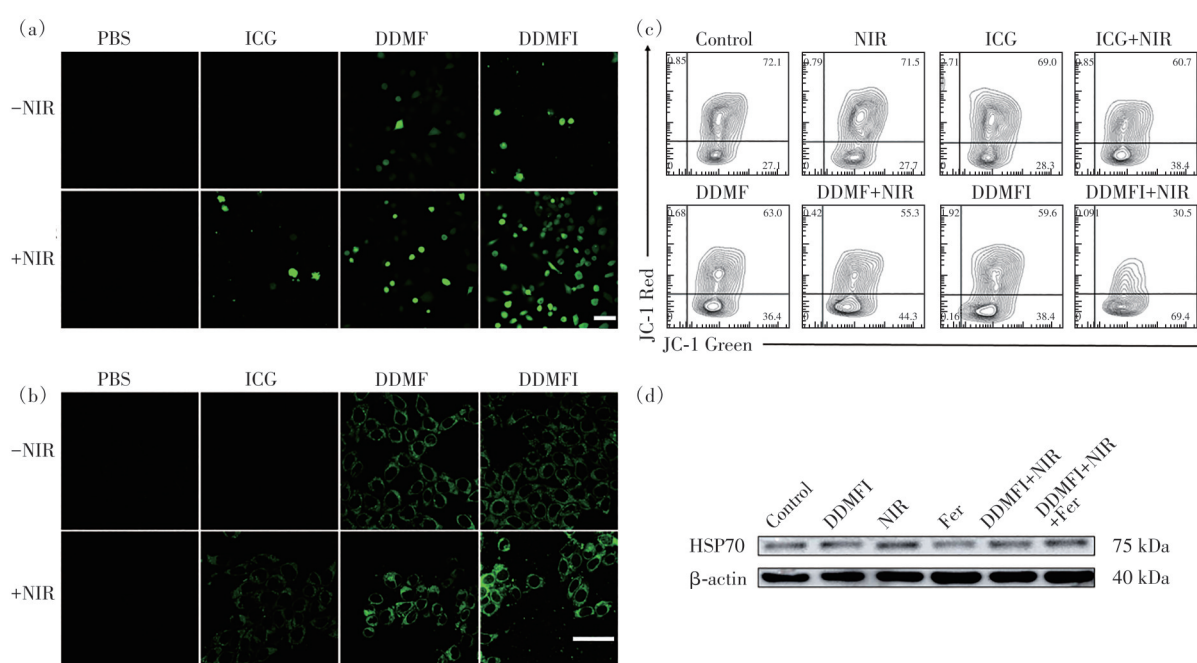


图 6 (a)不同组经过 DCFH-DA 染色处理后激光扫描共聚焦显微镜拍摄图片, 标尺为 50 μm ; (b)不同组处理后 JC-1 流式细胞仪检测线粒体膜电位结果; (c)不同组经过 Liperfluo 染色处理后激光扫描共聚焦显微镜拍摄图片, 标尺为 50 μm ; (d)不同组处理后 HSP70 的 WB 结果

Fig.6 (a) Pictures of different groups after treatment with DCFH-DA detected by confocal laser scanning microscope, scale bar is 50 μm . (b) Mitochondrial membrane potentials after treatment with JC-1 detected by flow cytometry in different groups. (c) Pictures of different groups after treatment with Liperfluo detected by confocal laser scanning microscope, scale bar is 50 μm . (d) Western blot analysis HSP70 protein levels with different treatment

3.5 材料体内抗肿瘤效果

在细胞层次证实了 DDMFI 的 mPTT/CDT/PDT 协同治疗能力后, 我们进一步研究其体内抗肿瘤效果以及近红外光引导的活体成像。如图 7(a)所示, 我们测量了 DDMFI 在 808 nm 激光器激发下的近红外荧光光谱, 并使用 InGaAs 相机拍摄了不同浓度下 DDMFI 在体外的荧光成像图片。随后, 我们使用近红外二区活体成像系统对 DDMFI 的活体成像能力进行了评估。我们测量了 ICG 组、DCNP 组、

DDMFI 组的小鼠活体近红外荧光成像图片, 分别测量了肿瘤部位(图 7(b)中 1 号圈)、身体(图 7(b)中 2 号圈)、身体外部(图 7(b)中 3 号圈)的荧光强度, 计算出三组的信噪比(SNR)。计算公式为: $\text{SNR} = \frac{\text{平均荧光强度 1} - \text{平均荧光强度 3}}{\text{平均荧光强度 2} - \text{平均荧光强度 3}}$ 。通过 SNR 量化 ICG 和 DCNP 对 DDMFI 的近红外发射贡献。ICG 的 SNR 为 2.74, DCNP 的 SNR 为 3.95, DDMFI 的 SNR 为 6.17, 表明 41% 的荧光由 ICG 贡献, DCNP 贡献 59%。

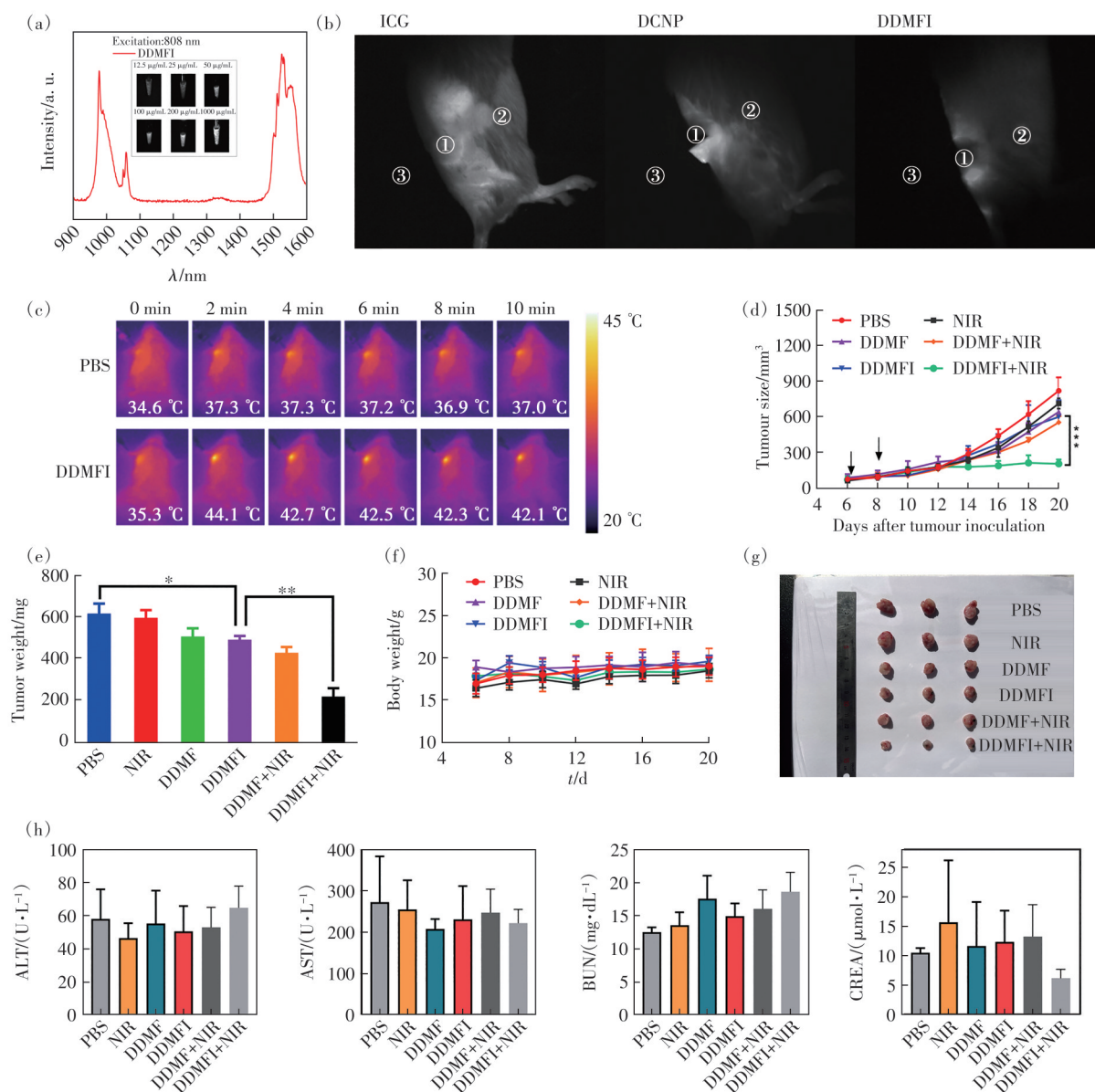


图7 (a)DDMFI在808 nm激光器激发下的近红外荧光光谱,插图为ep管中不同浓度下DDMFI的近红外荧光图片;(b)分别注射ICG、DCNP、DDMFI后小鼠活体近红外荧光成像图片;(c)808 nm激光器辐照下温和光热治疗热成像图片;不同治疗组的肿瘤生长曲线(图中箭头表示进行一次给药治疗)(d)、肿瘤质量(e)、体重变化(f)、离体肿瘤照片(g);(h)血清生化测试,包含肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和肾功能指标血尿素氮(BUN)、血清肌酐(CREA)

Fig.7 (a)The NIR fluorescence spectrum of DDMFI under 808 nm laser and the inserted pictures are different concentrations of DDMFI NIR fluorescence images. (b)In vivo NIR fluorescence bioimaging of the mice for group ICG, DCNP, DDMFI. (c)Thermal image of mild photothermal therapy under 808 nm laser irradiation. The tumor growth curve(The arrow indicates a single dose of drug treatment)(d), tumor weight(e), body weight change(f), and digital pictures of isolated tumor(g) in different treatment groups. (h)Serum biochemistry data including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase(AST) as hepatic function indicators, blood urea nitrogen(BUN) and serum creatinine(CREA) as renal function indicators were measured

4T1 荷瘤小鼠被随机分为6组:PBS, NIR, DDMF, DDMF+NIR, DDMFI, DDMFI+NIR。如图7(c)所示,在温和光热治疗过程中小鼠肿瘤温度在43℃左右,开始最高到44.1℃,随后又下降到

42.1℃,温度的小幅度波动可能是因为ICG不稳定的光热效应造成的。如图7(d)~(g)所示,PBS注射组和单独NIR光照组中的肿瘤生长迅速,DDMF和DDMFI组的抑制作用不明显,DDMF+

NIR 组的肿瘤生长的抑制作用有限。DDMFI+NIR 组表现出最强的抗肿瘤功效, 证明 NIR 激发的 PDT 和 TME 响应的 CDT 诱导的 mPTT 可以有效地抑制活体肿瘤生长。定期称量各组的小鼠体重, 均没有观察到体重的明显变化, 表明治疗没有产生全身毒性。结果显示, DDMF 和 DDMFI 注射组与未经处理的对照组之间的各项指标均无明显差异。如图 7(h) 所示, 药物处理组小鼠的肝功能指标(丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST))和肾功能指标(血尿素氮(BUN)和血清肌酐(CREA))均在正常范围内, 进一步表明基于 DDMFI 的光热治疗具有较好的生物安全性。以上结果表明, NIR 激发的 DDMFI 呈现 CDT/PDT/mPTT 协同抗肿瘤的效果, 且在体内未出现明显副作用。

4 结 论

本研究成功制备了具有光热转换性能、模拟酶活性、动力学效应和荧光成像能力的 DC-NP@DMSN@MnFe₂O₄-ICG 复合纳米治疗平台。该纳米平台呈现肿瘤微环境响应性的化学动力学效应和近红外光激发的光动力学效应, 产生的 ROS 及 LPO 可下调低温光热处理产生的热应激性 HSP70 的表达, 实现动力学效应诱导的 mPTT, 并显示出良好的抗肿瘤性能。同时, DCNP@DMSN@MnFe₂O₄-ICG 具备近红外二区荧光成像功能, 可实现对活体肿瘤的定位。

本文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.20240202>

参 考 文 献:

- [1] CAO W, CHEN H D, YU Y W, *et al.* Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2021, 134(7): 783-791.
- [2] 常梦宇, 王曼, 侯智尧, 等. 纳米材料在肿瘤光热治疗中存在的问题及解决策略 [J]. *发光学报*, 2022, 43(7): 995-1013.
 CHANG M Y, WANG M, HOU Z Y, *et al.* Problems and solutions of nanomaterials in antitumor photothermal therapy [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2022, 43(7): 995-1013. (in Chinese)
- [3] NG K K, ZHENG G. Molecular interactions in organic nanoparticles for phototheranostic applications [J]. *Chem. Rev.*, 2015, 115(19): 11012-11042.
- [4] ZHOU J, LI M H, HOU Y H, *et al.* Engineering of a nanosized biocatalyst for combined tumor starvation and low-temperature photothermal therapy [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(3): 2858-2872.
- [5] MA L L, ZHOU Y L, ZHANG Z W B, *et al.* Multifunctional bioactive Nd-Ca-Si glasses for fluorescence thermometry, photothermal therapy, and burn tissue repair [J]. *Sci. Adv.*, 2020, 6(32): eabb1311.
- [6] ESTERBAUER H, WÄG G, PUHL H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis [J]. *Br. Med. Bull.*, 1993, 49(3): 566-576.
- [7] KAUR K, SALOMON R G, O'NEIL J, *et al.* (Carboxyalkyl)pyrroles in human plasma and oxidized low-density lipoproteins [J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, 10(12): 1387-1396.
- [8] GAO G, SUN X B, LIANG G L. Nanoagent-promoted mild-temperature photothermal therapy for cancer treatment [J]. *Adv. Funct. Mater.*, 2021, 31(25): 2100738.
- [9] YING W W, ZHANG Y, GAO W, *et al.* Hollow magnetic nanocatalysts drive starvation-chemodynamic-hyperthermia synergistic therapy for tumor [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(8): 9662-9674.
- [10] GÜRBÜZ G, HEINONEN M. LC-MS investigations on interactions between isolated β -lactoglobulin peptides and lipid oxidation product malondialdehyde [J]. *Food Chem.*, 2015, 175: 300-305.
- [11] GASCHLER M M, STOCKWELL B R. Lipid peroxidation in cell death [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, 482(3): 419-425.
- [12] 刘庄, 冯良珠. 光功能纳米材料与肿瘤光学治疗展望 [J]. *发光学报*, 2020, 41(11): 1339-1342.
 LIU Z, FENG L Z. Perspectives on photo-functional nanomaterials and cancer phototherapy [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2020, 41(11): 1339-1342. (in Chinese)
- [13] BLANCO-COLINO R, ESPIN-BASANY E. Intraoperative use of ICG fluorescence imaging to reduce the risk of anastomotic

- leakage in colorectal surgery: a systematic review and meta-analysis [J]. *Tech. Coloproctol.*, 2018, 22(1): 15-23.
- [14] HUANG H Y, HE S Y, WEI R X, *et al.* Near-infrared (NIR) imaging with indocyanine green (ICG) may assist in intra-operative decision making and improving surgical margin in bone and soft tissue tumor surgery [J]. *J. Surg. Oncol.*, 2023, 128(4): 612-627.
- [15] TIAN Q W, XUE F F, WANG Y R, *et al.* Recent advances in enhanced chemodynamic therapy strategies [J]. *Nano Today*, 2021, 39: 101162.
- [16] MOU J, LIN T Q, HUANG F Q, *et al.* Black titania-based theranostic nanoplatform for single NIR laser induced dual-modal imaging-guided PTT/PDT [J]. *Biomaterials*, 2016, 84: 13-24.
- [17] WEN M, OUYANG J, WEI C W, *et al.* Artificial enzyme catalyzed cascade reactions: antitumor immunotherapy reinforced by NIR-II light [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, 58(48): 17425-17432.
- [18] DING B B, ZHENG P, JIANG F, *et al.* MnO_x nanospikes as nanoadjuvants and immunogenic cell death drugs with enhanced antitumor immunity and antimetastatic effect [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, 132(38): 16523-16526.
- [19] WANG M F, DENG K R, LÜ W, *et al.* Rational design of multifunctional Fe@ γ -Fe₂O₃@H-TiO₂ nanocomposites with enhanced magnetic and photoconversion effects for wide applications: from photocatalysis to imaging-guided photothermal cancer therapy [J]. *Adv. Mater.*, 2018, 30(13): 1706747.
- [20] CHANG M Y, WANG M, WANG M F, *et al.* A multifunctional cascade bioreactor based on hollow-structured Cu₂MoS₄ for synergetic cancer chemo-dynamic therapy/starvation therapy/phototherapy/immunotherapy with remarkably enhanced efficacy [J]. *Adv. Mater.*, 2019, 31(51): 1905271.
- [21] MENG L C, WANG Q L, WANG L, *et al.* miR122-controlled all-in-one nanoplatform for *in situ* theranostic of drug-induced liver injury by visualization imaging guided on-demand drug release [J]. *Mater. Today. Bio.*, 2021, 12: 100157.
- [22] LIU Q, FENG W, YANG T S, *et al.* Upconversion luminescence imaging of cells and small animals [J]. *Nat. Protoc.*, 2013, 8(10): 2033-2044.
- [23] 王敏娟, 王兴凤, 包永芬, 等. 近红外 II 区有机荧光探针的构筑与生物成像研究进展 [J]. *云南化工*, 2024, 51(8): 6-14.
- WANG M J, WANG X F, BAO Y F, *et al.* Design of near-infrared organic fluorescence probes and their progress in bio-imaging [J]. *Yunnan Chem. Technol.*, 2024, 51(8): 6-14. (in Chinese)
- [24] 张松涛, 王樱蕊, 张洪杰. 稀土发光材料在近红外二区成像中的应用 [J]. *发光学报*, 2020, 41(12): 1460-1478.
- ZHANG S T, WANG Y H, ZHANG H J. Lanthanide-doped fluorescence probes for NIR- II fluorescence imaging [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2020, 41(12): 1460-1478. (in Chinese)
- [25] 张文, 黄萍, 委娇娇, 等. 稀土掺杂无机纳米晶及其时间分辨荧光生物检测应用 [J]. *中国稀土学报*, 2021, 39(1): 35-57.
- ZHANG W, HUANG P, WEI J J, *et al.* Lanthanide-doped inorganic luminescent nanocrystals and their application for time-resolved luminescent biodetection [J]. *J. Chin. Soc. Rare Earths*, 2021, 39(1): 35-57. (in Chinese)
- [26] MANZANO M, VALLET-REGÍ M. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery [J]. *Adv. Funct. Mater.*, 2020, 30(2): 1902634.
- [27] DUAN Y, YANG H, GAO J X, *et al.* Immune modulator and low-temperature PTT-induced synergistic immunotherapy for cancer treatment [J]. *ACS Appl. Bio. Mater.*, 2021, 4(2): 1524-1535.
- [28] LV R H, WANG H H, JI Y S, *et al.* Co-delivery of curcumin and doxorubicin using a pH-photothermal dual-responsive and CD44-targeted nanocarrier for enhanced chemo-photothermal synergistic tumor treatment [J]. *ChemNanoMat*, 2024, 10(2): e202300353.
- [29] LI X Q, CAO Y, XU B, *et al.* A bimetallic nanozyme with cascade effect for synergistic therapy of cancer [J]. *ChemMedChem*, 2022, 17(8): e202100663.
- [30] BIAN Y L, LIU B, LIANG S, *et al.* Cu-based MOFs decorated dendritic mesoporous silica as tumor

microenvironment responsive nanoreactor for enhanced tumor multimodal therapy [J]. *Chem. Eng. J.*, 2022, 435: 135046.



罗嘉民(1997-),男,江西萍乡人,博士研究生,2022年于广州医科大学获得硕士学位,主要从事纳米材料的肿瘤治疗研究。

E-mail: 19128913970@163.com



侯智尧(1980-),男,黑龙江哈尔滨人,博士,教授,2009年于哈尔滨工程大学获得博士学位,主要从事新型纳米光能转换材料的构建及其在肿瘤光学诊疗中的应用研究。

E-mail: zyhou@gzhmu.edu.cn



田秀梅(1978-),女,黑龙江海林人,博士,教授,2012年于中山大学获得博士学位,主要从事纳米药物临床前研究。

E-mail: tianxiumei224@163.com