DOI:10.16016/j.1000-5404.202011241

基于 DVDMS/IR780 复合纳米粒抗肿瘤声动力实验研究

李倩茹[1],郝 兰[2],王艺睿[1],林晓红[2],王志刚[2],袁耿彪[1] 400010 重庆,重庆医科大学:附属第二医院核医学科[1],超声影像学研究所[2]

[摘要] **目的** 制备一种搭载华卟啉钠(sinoporphyrin sodium,DVDMS)、IR780 与全氟己烷(perfluorinated hexane,PFH)的聚乳酸-乙醇酸(poly lactic-co-glycolic acid,PLGA)肿瘤靶向多功能复合纳米粒(DIPP-NPs),评估其理化性质,探讨敏化剂 DVDMS、IR780 的协同增强声动力治疗(sonodynamic therapy,SDT)作用。**方法** 用超声双乳化法制备 DIPP-NPs,对其进行基本表征;采用光镜记录超声辐照前后纳米粒的变化;超声/光声成像系统评价其体外成像能力;激光共聚焦显微镜评价 PP-NPs、DPP-NPs、IPP-NPs、DIPP-NPs 4 种纳米粒对 4T1 乳腺癌细胞的体外靶向能力;单线态氧检测法(singlet oxygen sensor green reagent, SOSG)评价其体外活性氧产量;CCK-8 法评价其细胞毒性;将 4T1 乳腺癌细胞分为阴性对照组、仅 US 组、仅 DIPP-NPs 组、DPP-NPs+US 组、IPP-NPs+US 组、DIPP-NPs+US 组($n=3$),通过 CCK-8 法检测各组细胞存活率来评价其体外 SDT 效果;建立 4T1 乳腺癌荷瘤鼠模型并分为阴性对照组、仅 US 组、仅 DIPP-NPs 组、DPP-NPs+US 组、IPP-NPs+US 组、DIPP-NPs+US 组($n=3$),通过测量各组荷瘤鼠肿瘤体积/质量,计算肿瘤体积/质量抑制率来评价其体内 SDT 效果。**结果** 成功制备 DIPP-NPs,不同显微镜下观察呈圆球形,大小均一,粒径(341.17±16.97)nm,电位(-12.77±0.88)mV,DVDMS、IR780 的包封率分别为(92.84±1.58)%、(96.57±1.48)%;DIPP-NPs 经超声辐照后发生相变,光镜下观察到其直径随辐照时间延长而增大,体外超声成像显示其回声强度随辐照时间延长而增强;体外光声成像显示其光声信号随纳米粒浓度升高而增强;激光共聚焦显微镜观察到 DIPP-NPs 组中 4T1 细胞周围的纳米粒明显多于其他 3 组;SOSG 体外活性氧检测结果发现 DIPP-NPs 的活性氧产量随辐照时间延长而增加;CCK-8 细胞毒性检测结果显示不同浓度 DIPP-NPs 未见明显细胞毒性;体外 SDT 结果显示 DIPP-NPs+US 组的细胞存活率为(56.04±2.28)%,明显低于 DPP-NPs+US 组[(76.83±1.52)%]、IPP-NPs+US 组[(74.03±2.64)%],差异具有统计学意义($P<0.05$);体内 SDT 实验结果显示 DIPP-NPs+US 组的肿瘤体积/质量抑制率为(73.28±1.58)% /(75.76±3.49)%,明显高于 DPP-NPs+US 组[(46.93±4.41)%/(43.50±2.27)%]与 IPP-NPs+US 组[(47.44±1.27)%/(44.87±4.30)%],差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 成功制备肿瘤靶向多功能复合纳米粒 DIPP-NPs,其具有良好的协同增强 SDT 作用。

[关键词] 华卟啉钠;IR780;聚乳酸-乙醇酸;肿瘤靶向;纳米粒子;声动力治疗;协同作用
[中图法分类号] R454.3; R730.5; R944.9 [文献标志码] A

Preparation of sinoporphyrin sodium and IR780-based composite nanoparticles and its anti-tumor efficacy in sonodynamic therapy

LI Qianru[1], HAO Lan[2], WANG Yirui[1], LIN Xiaohong[2], WANG Zhigang[2], YUAN Gengbiao[1] [1]Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, [2]Chongqing Key Laboratory of Ultrasound Molecular Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To prepare the tumor targeting multifunctional composite nanoparticles (DIPP-NPs) by encapsulating sinoporphyrin sodium (DVDMS), IR780 and perfluorinated hexane (PFH),

[基金项目] 重庆市基础研究与前沿探索项目(CSTC2018jcyJA0389);重庆市技术创新与应用发展专项重点项目(CSTC2019jscx-dxwtBX0004)
[通信作者] 袁耿彪,E-mail:yuan_gb@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

evaluate their physicochemical properties, and explore the synergistic enhancement of sonodynamic therapy (SDT) between DVDMS and IR780. **Methods** DIPP-NPs were synthesized *via* double emulsion and then characterized. The changes of nanoparticles before and after ultrasonic irradiation were observed by optical microscopy. Ultrasonic and photoacoustic imaging systems were used to evaluate the imaging capability *in vitro*. Targeting ability *in vitro* was evaluated by confocal laser scanning microscopy. The production of reactive oxygen species (ROS) was demonstrated by singlet oxygen detection (SOSG). CCK-8 assay was used to detect the cytotoxicity and synergistic enhancement of SDT in murine mammary carcinoma cell line 4T1. The synergistic enhancement of SDT in 4T1 xenograft mouse model was evaluated by measuring tumor volume and weight to calculate the inhibitory rates. **Results** DIPP-NPs were successfully prepared, as uniform round-shaped particles, 341.17±16.97 nm in diameter and −12.77±0.88 mV in Zeta potential. The encapsulation rate of DVDMS and IR780 was (92.84±1.58) % and (96.57±1.48) %, respectively. After irradiated with ultrasonic, DIPP-NPs were getting bigger and bigger in diameter under a optical microscope. Meanwhile, ultrasound imaging results showed that the ultrasound signals were enhanced with prolonged irradiation time. In addition, photoacoustic imaging results showed that the photoacoustic signal intensity was increased with the increment of nanoparticle concentration. Laser confocal microscopy demonstrated that there were more nanoparticles around 4T1 cells in DPP-NPs, IPP-NPs and DIPP-NPs groups than in PP-NPs group. SOSG detection results showed that the production of ROS was gradually increased with prolonged irradiation time. CCK-8 assay indicated that there was no obvious cytotoxicity of the nanoparticles and the cell viability in DIPP-NPS+US group was (56.04±2.28)%, which was obviously lower than that in DPP-NPS+US [(76.83±1.52)%] and IPP-NPS +US groups [(74.03±2.64)%, both $P<0.05$]. Xenograft experiment showed that the inhibitory rate was (73.28±.58)% for tumor volume, and (75.76±3.49)% in weight in DIPP-NPS+US group, which were significantly higher than those in DPP-NPS+US [(46.93±4.41)%, (43.50±2.27)%] and the IPP-NPS+US groups [(47.44±1.27)%, (44.87±4.30)%, $P<0.05$]. **Conclusion** The tumor-targeting multifunctional composite nanoparticles DIPP-NPs are successfully prepared, which have a good synergistic enhancement of SDT effectiveness.

[**Key words**] sinoporphyrin sodium; IR780; poly lactic-co-glycolic acid; tumor targeting; nanoparticles; sonodynamic therapy; synergistic effect

Supported by the Project of Basic Research and Frontier Exploration of Chongqing (CSTC2018jcyJA0389) and the Key Special Project of Chongqing Technology Innovation and Application Development (CSTC2019 jscx-dxwtBX0004). Corresponding author: YUAN Gengbiao, E-mail: yuan-gb@126.com

恶性肿瘤已成为威胁人类健康的主要原因之一[1],目前的治疗方式虽能在一定程度上抑制肿瘤生长,但其不良反应不容忽视[2],因此,寻找新的抗肿瘤治疗方法迫在眉睫。声动力治疗(sonodynamic therapy,SDT)是近年来兴起的新型治疗方法,是将超声波和声敏剂结合,通过超声空化作用、氧自由基产生氧化损伤等机制诱导细胞凋亡,抑制肿瘤增殖,具有无创、低成本、高选择性、高组织穿透性等优点[3-4]。声敏剂是SDT发生的关键因素。然而,传统有机声敏剂水溶性低,化学、生物稳定性差,血流清除快,从而导致肿瘤聚集性差、治疗效果差等问题[5]。纳米医学的快速发展为解决这一问题带来了希望,基于各种敏化剂的纳米颗粒得到广泛应用,如基于华卟啉钠(sinoporphyrin sodium,DVDMS)的仿生纳米粒EXO-DVDMS、基于IR780的脂质体纳米粒IR780-NDs等[6-7]。现有研究表明:DVDMS、IR780均是性能良好的声敏剂,主要位于肿瘤细胞的线粒体中,可被超声有效激活,导致肿瘤细胞的损伤,对正常细胞的毒性较小[7-8]。全氟己烷(perfluorinated hexane,PFH)作为液态氟碳中的一员,支持通过液气相变进行超声成像[9]。

基于此研究现状,我们设想将DVDMS、IR780包载到同一纳米粒中,以达到1+1>2的效果。为了验证这一科学假设,本研究选用FDA认证的聚乳酸-乙醇酸(poly lactic-co-glycolic acid,PLGA)纳米材料,制备搭载DVDMS、IR780和PFH的多功能复合纳米粒DIPP-NPs,旨在探讨其协同增强SDT作用,为进一步开发靶向SDT分子探针提供新的可能。考虑到超声/光声成像技术更适用于浅表肿瘤的诊断与监控,故选用乳腺癌为本实验研究模型。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 包括:羧基端乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGACOOH,聚合比 50∶50,济南岱罡);IR780 碘化物(美国 Sigma 公司);DVDMS(青龙高科技股份有限公司);PFH(上海麦克林生化科技有限公司);Dil(碧云天生物公司);DAPI(博士德生物公司);单线氧荧光探针(singlet oxygen sensor green reagent,SOSG,美国 Thermo Fisher 公司);CCK-8 试剂盒(东仁化学有限公司);小鼠乳腺癌 4T1 细胞(重庆医科大学超声影像学研究所)。

1.1.2 主要仪器 包括:声振仪(Sonic,美国);磁力搅拌器(DF-101,德国);光学显微镜(Olympus IX71,日本);透射电镜(HITACHI,日本);粒径测量仪(Malvern 公司,英国);紫外可见光分光光度计(岛津 2500UV-VIS,日本);激光共聚焦显微镜(Nikon 公司,日本);流式细胞仪(Beckman coulter 公司,美国);多功能酶标仪(Thermo 公司,美国);小动物光声成像仪(Vevo® LAZR2100,加拿大);低强度聚焦超声治疗仪(LIFU,重庆医科大学超声分子影像学研究所研制)。

1.2 方法

1.2.1 DIPP-NPs 的制备及表征 超声双乳化法制备纳米粒,将 1 mg DVDMS 溶解于 100 μL PBS 溶液中,25 mg PLGA、1 mg IR780 溶解于 1 mL 三氯甲烷溶液中(油相);再将溶解好的 DVDMS 溶液(水相)、PFH 溶液(水相)各 100 μL 加到溶解好的油相溶液中,用声震仪(3 min,震 5 s、停 5 s,功率 45%)进行第 1 次乳化;再向其中加入 4 mL 4% PVA 溶液,再次声震仪乳化(3 min,震 5 s、停 5 s,功率 30%);最后加入 5 mL 2%的异丙醇,混合乳液磁力搅拌 4~6 h;待三氯甲烷完全挥发后,双蒸水离心洗涤(11 000 r/min,5 min)3 次,制备获得 DIPP-NPs,于 4 ℃条件下保存备用。以上所有步骤均在避光、冰浴条件下进行。DPP-NPs(未添加 IR780)、IPP-NPs(未添加 DVDMS)、PP-NPS(IR780、DVDMS 均未添加)3 种纳米粒的制备与上述过程类似。

DIPP-NPs 制备成功后,肉眼观察其外观性状;光镜、激光共聚焦显微镜、透射电镜下观察其形态及结构特征;Malvern 粒径仪检测其粒径大小、电位分布;紫外分光光度计检测其光密度值,绘制紫外吸收光谱图;标准曲线法计算 DVDMS、IR780 的包封率。DVDMS/IR780 包封率 = $M_1/M_2\times100\%$,M_1 表示包载于 PLGA 纳米粒中的 DVDMS/IR780 含量,M_2 表示 DVDMS/IR780 的投入总量。

1.2.2 DIPP-NPs 体外超声/光声成像实验 将 DIPP-NPs(1 mL,1 mg/mL)加入凝胶模型后进行超声辐照(3 W,0、60、180、300 s;辐照条件根据本实验室既往研究选定),光镜下观察、记录纳米粒的变化,超声成像系统评价其体外超声成像能力,DFY-Ⅱ型超声图像定量分析仪分析各靶区声强值。

将 DIPP-NPs(200 μL,1 mg/mL)加入凝胶模型后,光声成像系统行全波长(680~970 nm)扫描,选取光声值最大处对应波长的激光,激发不同浓度 DIPP-NPs(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL),采集各组光声图像,并定量分析各组光声信号强度。

1.2.3 DIPP-NPs 体外靶向实验 将处于对数期的 4T1 细胞(1×10^5/皿)接种于共聚焦培养皿中,24 h 后将细胞分为以下 4 组:PP-NPs 组、DPP-NPs 组、IPP-NPs 组、DIPP-NPs 组。各组加入等量(50 mg/mL,1 mL/皿)DiI 标记的相应纳米粒,与细胞共培养 4 h 后,PBS 多次洗涤、清除未靶向的纳米粒,4%多聚甲醛 1 mL 固定细胞 15 min,DAPI 染料 200 μL 染色细胞核 15 min。激光共聚焦显微镜观察纳米粒与细胞的结合情况。

1.2.4 DIPP-NPs 体外活性氧检测实验 用 SOSG 作为单线态氧指示剂。将 DIPP-NPs(1.2 mL,100 μg/mL)、SOSG 甲醇溶液(0.3 mL)、PBS(1.5 mL)充分混匀,混合物经由超声辐照(3 W,0、15、30、60、120、240 s;辐照条件根据本实验室既往研究选定),荧光分光光度计记录 500~700 nm 上 SOSG 的荧光强度。

1.2.5 DIPP-NPs 的细胞毒性及其体外声动力治疗实验 在 5%CO_2、37 ℃培养箱中用 DMEM 完全培养基(10%胎牛血清、1%双抗)培养 4T1 细胞,实验均采用对数期生长细胞。将 4T1 细胞(1×10^4/孔)接种于 96 孔板中,24 h 后分为 6 组,每组 3~5 个复孔。各组加入等量(200 μL/孔)不同浓度 DIPP-NPs 培养基稀释液(0、20、40、60、80、100 μg/mL),与细胞共培养 24 h 后,加入 CCK-8 试剂,继续培养 1~4 h,多功能酶标仪检测并计算细胞存活率。

将 4T1 细胞(1×10^4/孔)接种于 96 孔板中,24 h 后分为以下 6 组:阴性对照组、仅 US 组、仅 DIPP-NPs 组、DPP-NPs+US 组、IPP-NPs+US 组、DIPP-NPs+US 组,每组 3~5 个复孔。各组加入等量(50 μg/mL,200 μL/孔)相应纳米粒后进行超声辐照(3 W,30 s;辐照条件根据本实验室既往研究选定)。于辐照后 2 h 加入 CCK-8 试剂继续培养 1~4 h,多功能酶标仪检测并计算细胞存活率。

1.2.6 动物模型的建立及 DIPP-NPs 的体内声动力治疗实验 选取 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠(16~20 g)18 只,将 4T1 细胞悬液(1×10^6/mL)皮下注射于小鼠右侧腹部(0.1 mL/只)建立荷瘤鼠模型,待肿瘤

体积长至约 100 mm^3,用于体内声动力治疗研究。

将 18 只荷瘤小鼠分为以下 6 组(n=3):阴性对照组、仅 US 组、仅 DIPP-NPs 组、DPP-NPs+US 组、IPP-NPs+US 组、DIPP-NPs+US 组。各组经尾静脉注射等量(3 mg/mL,200 μL)相应纳米粒或生理盐水后 24 h,用涂抹了耦合剂的超声探头对荷瘤鼠肿瘤部位进行垂直辐照(3 W,3 min;辐照条件根据本实验室既往研究选定)。上述治疗过程每 3 天重复 1 次,肿瘤体积每 2 天记录 1 次,连续 16 d。肿瘤体积(mm^3)=(短径^2×长径)/2。治疗周期结束后,剖离瘤块并称其质量,计算肿瘤体积/质量抑制率。肿瘤体积抑制率=($V_{对照组}$-$V_{实验组}$)/$V_{对照组}$×100%,肿瘤质量抑制率=($M_{对照组}$-$M_{实验组}$)/$M_{对照组}$×100%。

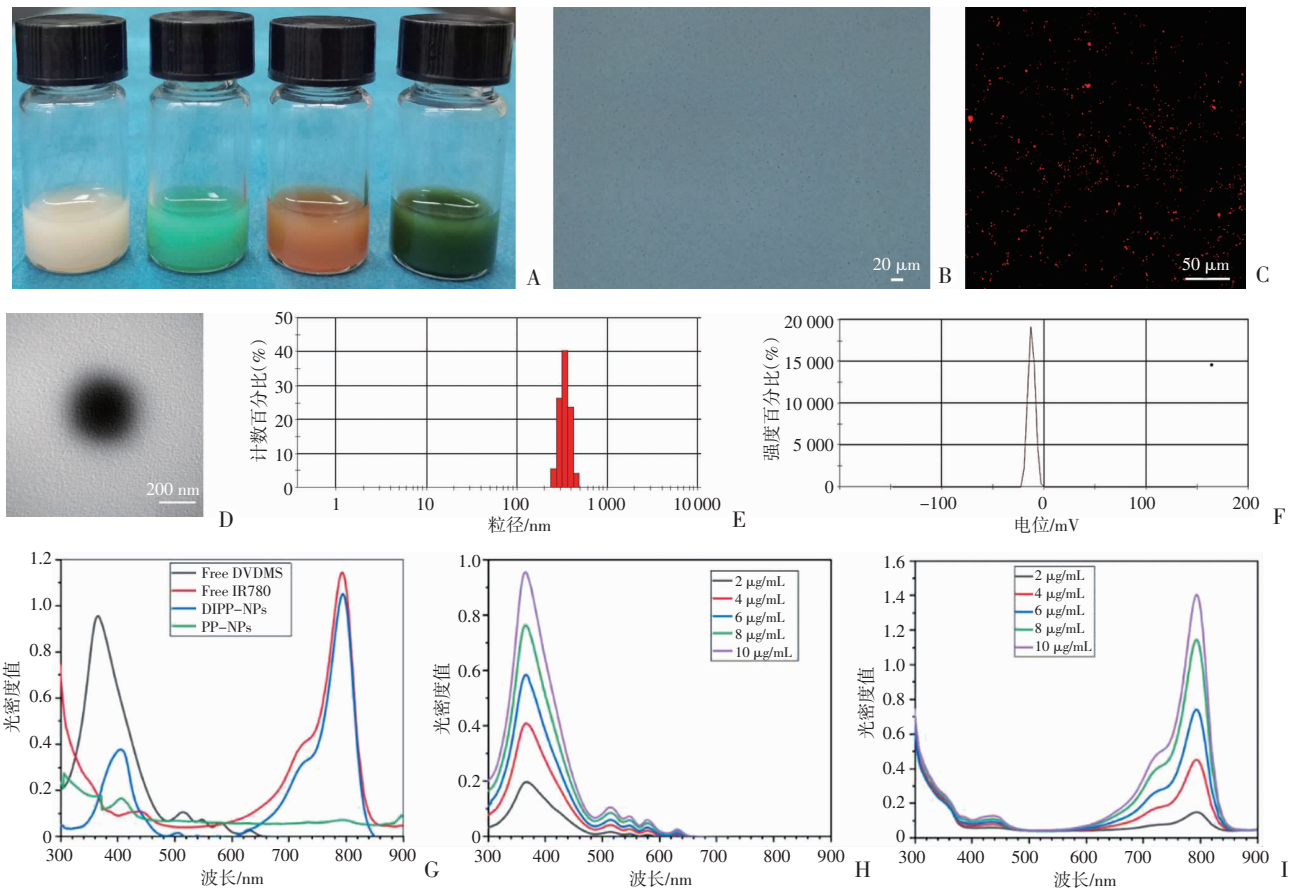
1.3　统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两变量比较采用线性相关分析,多样本均数比较采用单因素方差分析,两组间进一步比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　DIPP-NPs 的基本理化性质

成功制备 DIPP-NPs,肉眼观察呈墨绿色乳化液(图 1A);光镜下大小均一、分散性良好(图 1B);激光共聚焦显微镜下 DiI 标记的 DIPP-NPs 呈均一的红色颗粒(图 1C);透射电镜下呈圆球形(图 1D);马尔文粒径仪测得其粒径、电位分别为(341.17±16.97)nm(图 1E)、(-12.77±0.88)mV(图 1F);紫外吸收光谱图显示:DIPP-NPs 于 405、795 nm 处各出现了 1 个特征吸收峰(图 1G),说明 DVDMS、IR780 成功包载于 PLGA 纳米粒中;根据 DVDMS、IR780 的紫外吸收光谱图(图 1H、I)绘制 DVDMS、IR780 的标准曲线回归方程分别为:y=0.093 2x+0.021 9,R^2=0.998 9、y=0.320 3x-0.183 3,R^2=0.996 2。最后计算得到 DVDMS、IR780 的包封率分别为(92.84±1.58)%、(96.57±1.48)%。



A:纳米粒外观性状,从左到右依次为 PP-NPs、IPP-NPs、DPP-NPs、DIPP-NPs;B:DIPP-NPs 的光镜图;C:DIPP-NPs 的激光共聚焦显微镜图;D:DIPP-NPs 的透射电镜图;E:DIPP-NPs 的粒径分布;F:DIPP-NPs 的电位分布;G:不同纳米粒/材料的紫外吸收光谱图;H:DVDMS 的紫外吸收光谱图;I:IR780 的紫外吸收光谱图

图 1　DIPP-NPs 的基本理化性质

2.2 DIPP-NPs 的体外超声/光声成像能力

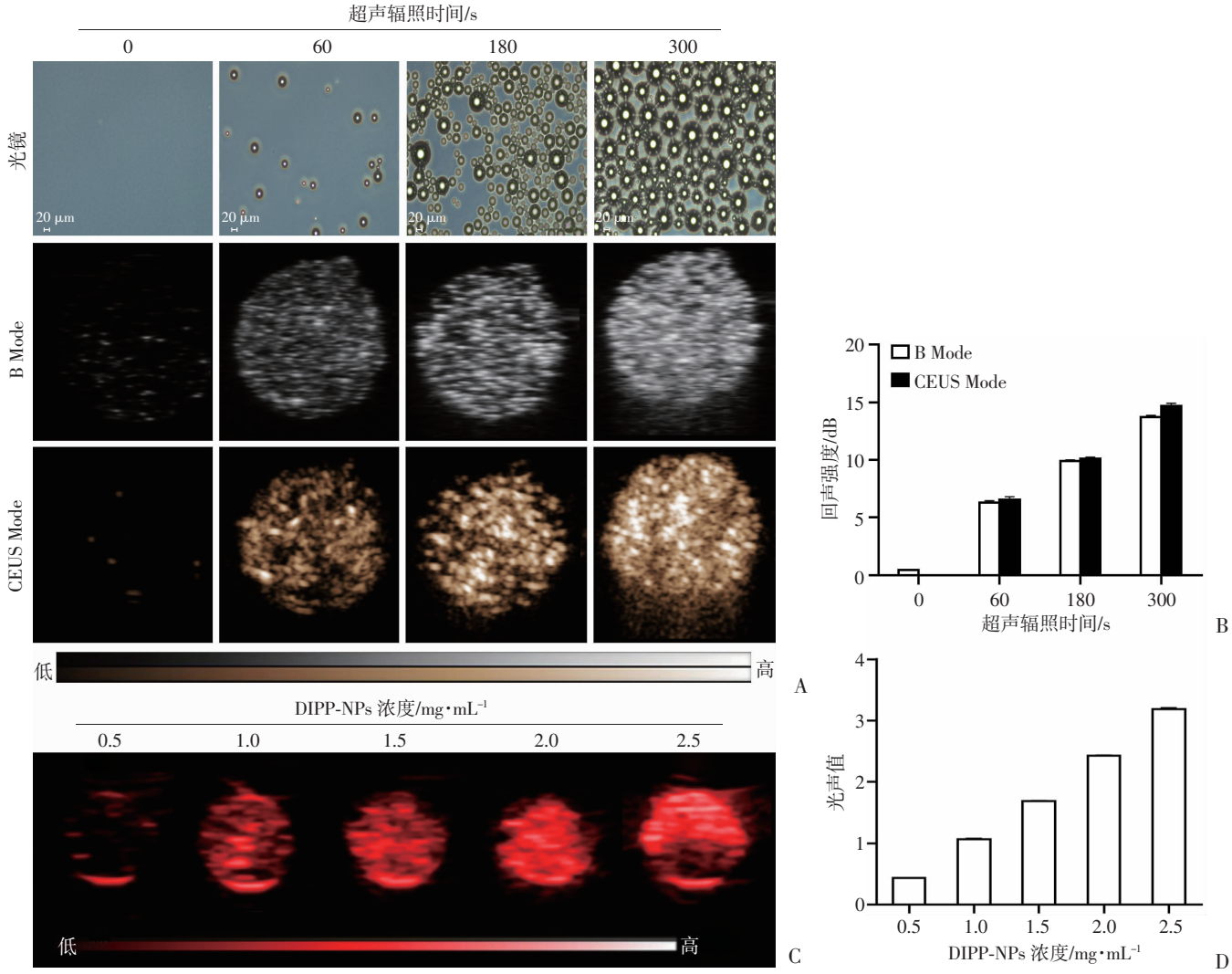
光镜下观察到随着超声辐照时间的延长,大量 DIPP-NPs 转化为微泡,其直径也由原来的 300 nm 左右增加至 20 μm 左右(图 2A),超声成像结果显示其回声信号随辐照时间逐渐增强(图 2B),回声强度定量分析结果与图像结果一致(图 2C);光声成像结果显示,DIPP-NPs 行全波长扫描后,于 795 nm 处出现光声信号最大值,在 λ=795 nm 的激光辐照下,光声信号随 DIPP-NPs 浓度线性增加(图 2D),光声信号定量分析结果与图像结果一致(图 2E)。以上结果表明 DIPP-NPs 具有良好的超声、光声成像能力。

2.3 DIPP-NPs 与 4T1 细胞的体外结合情况

与 4T1 细胞共培养 4 h 后,PP-NPs 组可见蓝染的细胞核周围仅有极少量 DiI 标记的红色纳米粒聚集,而 DPP-NPs 组、IPP-NPs 组、DIPP-NPs 组细胞核周围均可见大量红色纳米粒聚集,且 DIPP-NPs 组周围的红色纳米粒多于其他两组(图 3)。结果表明 DVDMS、IR780 均有助于纳米粒在肿瘤细胞的摄取,当 DVDMS、IR780 联合作用时,摄取作用增强。

2.4 DIPP-NPs 的体外活性氧产生情况

随着超声辐照时间的延长,含 DIPP-NPs 的 SOSG 甲醇溶液的荧光强度逐渐增强(图 4A)。表明产生的活性氧逐渐增多。



A:不同超声辐照条件下 DIPP-NPs 的体外相变光镜观察及超声/造影成像;B:不同超声辐照条件下 DIPP-NPs 体外超声/造影成像定量分析(n=3);C:不同浓度 DIPP-NPs 的体外光声成像;D:不同浓度 DIPP-NPs 的体外光声成像定量分析(n=3)

图 2 DIPP-NPs 的相变、体外超声/光声成像及定量分析

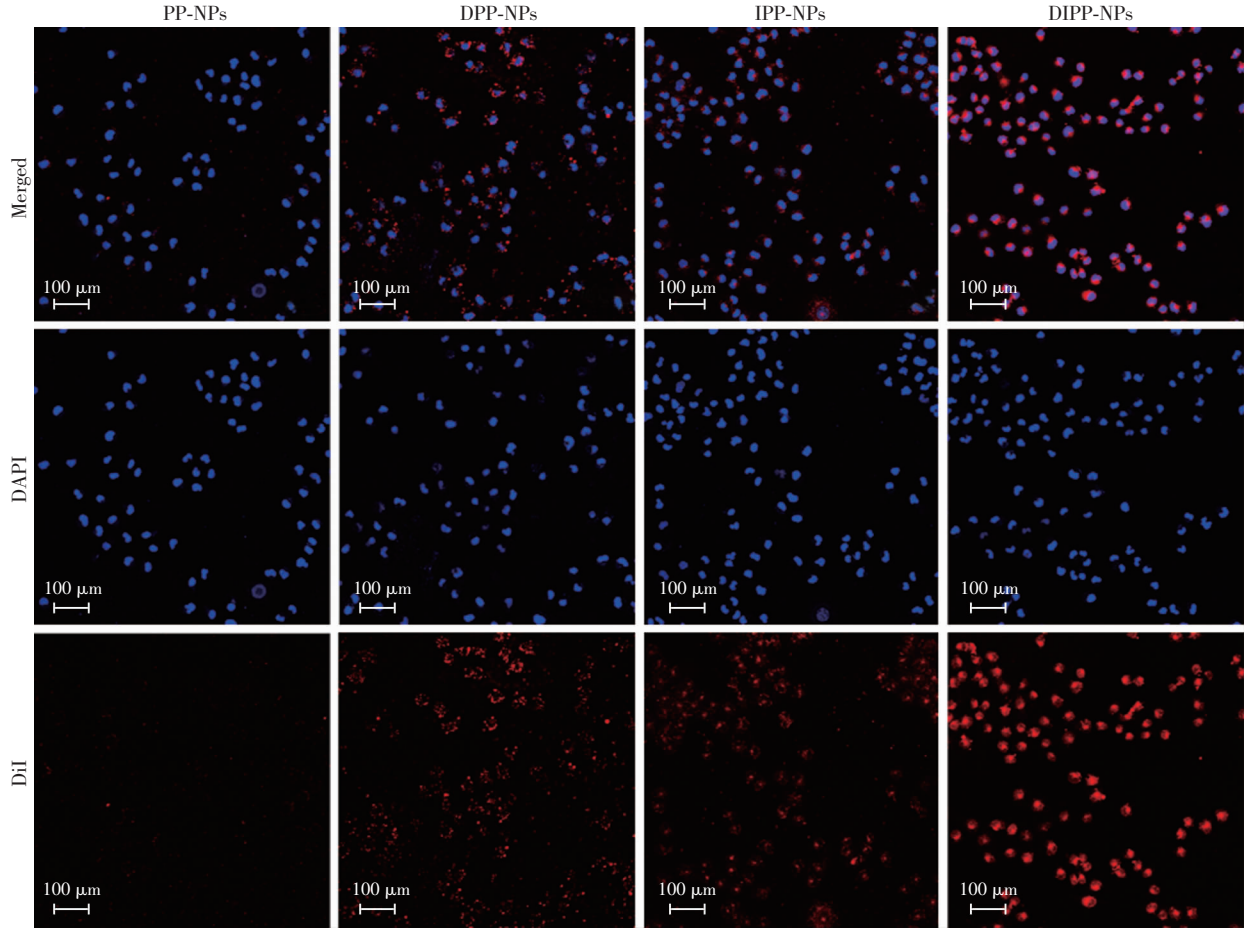
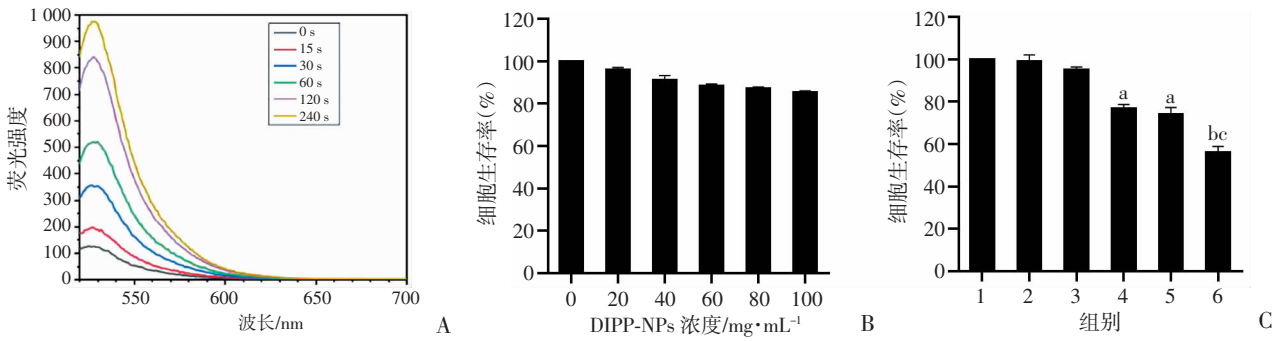


图 3　激光共聚焦显微镜观察 DIPP-NPs 与 4T1 细胞的结合情况



A:不同超声辐照条件下 SOSG 荧光强度;B:DIPP-NPs 的细胞毒性($n=3$);C:DIPP-NPs 的体外声动力治疗效果($n=3$)　1:阴性对照组;2:仅 US 组;3:仅 DIPP-NPs 组;4:DPP-NPs+US 组;5:IPP-NPs+US 组;6:DIPP-NPs+US 组;a:$P<0.05$,与阴性对照组比较;b:$P<0.05$,与 DPP-NPs+US 组比较;c:$P<0.05$,与 IPP-NPs+US 组比较

图 4　DIPP-NPs 的体外活性氧产量、细胞毒性及体外声动力治疗效果评价

2.5　DIPP-NPs 的细胞毒性及体外声动力治疗效果

细胞毒性结果显示(图 4B):4T1 细胞与不同浓度 DIPP-NPs 共培养 24 h 后,细胞存活率均无明显降低,表明 DIPP-NPs 具有较高的生物安全性,可进行下一步实验。

体外声动力治疗结果显示(图 4C):仅 US 组、仅 DIPP-NPs 组的细胞存活率与阴性对照组比较,差异无统计学意义,表明单纯超声辐照、单纯 DIPP-NPs 没有明显的细胞毒性;DPP-NPs+US 组、IPP-NPs+US 组与阴性对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),表明 DVDMS、IR780 介导的 SDT 抑制了肿瘤细胞的生长;此外,DIPP-NPs+US 组与 DPP-NPs+US 组、IPP-

NPs+US 组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),表明当 DVDMS、IR780 联合作用时,SDT 作用增强。

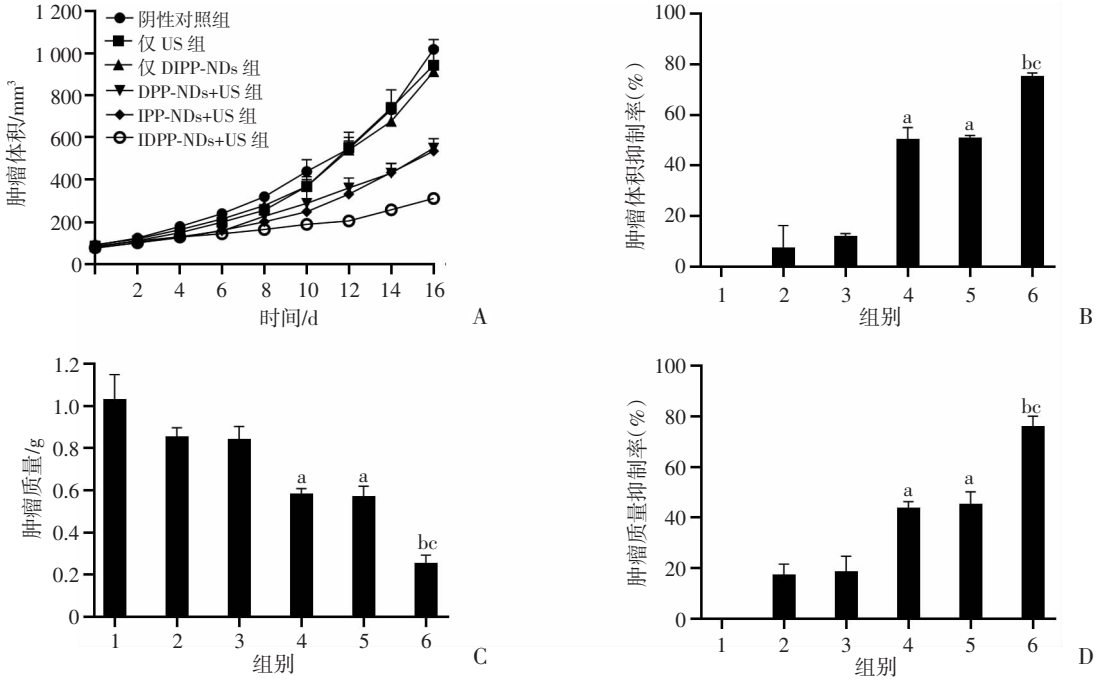
2.6 DIPP-NPs 的体内声动力治疗效果

阴性对照组、仅 US 组、仅 DIPP-NPs 组对肿瘤生长无明显影响,差异不具有统计学意义,表明单纯超声辐照、单纯 DIPP-NPs 没有明显的抗肿瘤活性;DPP-NPs+US 组、IPP-NPs+US 组与阴性对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),表明 DVDMS、IR780 介导的 SDT 抑制了肿瘤的生长;DIPP-NPs+US 组与 DPP-NPs+US 组、IPP-NPs+US 组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),表明当 DVDMS、IR780 联合作用时,SDT 作用增强(图 5)。

3 讨论

近年来,随着对 SDT 的深入研究,越来越多的优质声敏剂被发现、合成并应用。DVDMS 作为基于光卟啉合成的新一代声敏剂,其化学纯度为 98.7%,声活性远高于血卟啉单甲氧醚(HMME)等其他卟啉衍生物,具有水溶性强、皮肤敏感性较短、单线态氧产率高等优点,已获得中国自主知识产权[10-11]。IR780 作为具有肿瘤靶向性的经典敏化剂,其靶向性与肿瘤细胞质膜电位相对较高、肿瘤细胞上过表达的有机阴离子转运体多肽(OATPs)有关[12-13]。

受上述研究成果的启发,本研究成功构建复合纳米粒 DIPP-NPs。DIPP-NPs 的紫外图谱呈现双特征吸收峰,标准曲线法计算得到 DVDMS、IR780 的包封率分别为(92.84±1.58)%、(96.57±1.48)%,说明 DVDMS、IR780 成功且有效包载于 PLGA 纳米粒中。此外,本研究发现 DVDMS 包载于 PLGA 纳米粒中发生了红移现象,其紫外特征吸收峰从 367 nm 左右移动到 405 nm,这可能与包载后 DVDMS 的疏水作用、溶剂极性的变化有关[14]。体外靶向结果表明 IR780 的主动靶向性、DVDMS 的肿瘤聚集效应,使得 DIPP-NPs 可在肿瘤部位有效聚集。此外,结合肿瘤新生血管内皮间隙为 380~780 nm[15-16]、DIPP-NPs 的粒径为(341.17±16.97)nm,说明 DIPP-NPs 也可通过 EPR 效应聚集于肿瘤部位。敏化剂的有效包载与纳米粒肿瘤部位的有效聚集,为下一步发挥 SDT 作用奠定了基础。现有研究表明:纳米微泡介导的肿瘤 SDT 效应涉及多种机制,包括氧自由基损伤作用、超声空化效应、超声靶向肿瘤血管破坏技术等,尽管机制复杂,但活性氧的产生是关键因素之一[17-18]。本研究 SOSG 体外活性氧检测结果表明 DIPP-NPs 可在超声辐照下产生活性氧,结合体外细胞存活率的降低、体内肿瘤体积/质量抑制率的提高,均说明 DVDMS、IR780 介导的 SDT 抑制了肿瘤的生长,而当两者联合作用时,SDT 作用增强。本研究也存在一定的不足,如缺少其他肿瘤模型 SDT 作用对比研究,且结果尚需进一步体内实验验证。



1:阴性对照组;2:仅 US 组;3:仅 DIPP-NPs 组;4:DPP-NPs+US 组;5:IPP-NPs+US 组;6:DIPP-NPs+US 组; a:$P<0.05$,与阴性对照组比较;b:$P<0.05$,与 DPP-NPs+US 组比较;c:$P<0.05$,与 IPP-NPs+US 组比较

A:肿瘤体积变化;B:肿瘤体积抑制率;C:肿瘤质量;D:肿瘤质量抑制率

图 5 DIPP-NPs 的体内声动力治疗效果评价 ($n=3$)

综上所述,本研究成功构建肿瘤靶向多功能复合纳米粒 DIPP-NPs,实现了双敏化剂协同增强 SDT 作用,为建立高效、安全的肿瘤分子成像与靶向治疗方法提供了新的思路。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30. DOI:10.3322/caac.21332.

[2] MILLER K D, SIEGEL R L, LIN C C, *et al*. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289. DOI:10.3322/caac.21349.

[3] YAN P, LIU L H, WANG P. Sonodynamic therapy (SDT) for cancer treatment: advanced sensitizers by ultrasound activation to injury tumor[J]. ACS Appl Bio Mater, 2020, 3(6): 3456-3475. DOI:10.1021/acsabm.0c00156.

[4] MCHALE A P, CALLAN J F, NOMIKOU N, *et al*. Sonodynamic therapy: concept, mechanism and application to cancer treatment[M]//ESCOFFRE J M, BOUAKAZ A. Therapeutic Ultrasound. Cham: Springer International Publishing, 2016.

[5] QIAN X, HAN X, CHEN Y. Insights into the unique functionality of inorganic micro/nanoparticles for versatile ultrasound theranostics[J]. Biomaterials, 2017, 142: 13-30. DOI:10.1016/j.biomaterials.2017.07.016.

[6] LIU Y, BAI L, GUO K, *et al*. Focused ultrasound-augmented targeting delivery of nanosonosensitizers from homogenous exosomes for enhanced sonodynamic cancer therapy[J]. Theranostics, 2019, 9(18): 5261-5281. DOI: 10.7150/thno.33183.

[7] ZHANG L, YI H, SONG J, *et al*. Mitochondria-targeted and ultrasound-activated nanodroplets for enhanced deep-penetration sonodynamic cancer therapy[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(9): 9355-9366. DOI: 10.1021/acsami.8b21968.

[8] HU J M, WANG X B, ZHANG K, *et al*. Sinoporphyrin sodium: a novel sensitizer in sonodynamic therapy[J]. Anti-Cancer Drugs, 2014, 25(2): 174-182. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000031.

[9] 韩鹏, 汪洋, 朱斌. 全氟己烷脂质体纳米粒在超声造影方面价值的实验研究[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(19): 3038-3042. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.
HAN P, WANG Y, ZHU B. The application assessment of perfluorohexane based liposome nanoparticles on ultrasound enhanced imaging[J]. J Mod Oncol, 2018, 26(19): 3038-3042. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.

[10] HUANG J, LIU F, HAN X, *et al*. Nanosonosensitizers for highly efficient sonodynamic cancer theranostics[J]. Theranostics, 2018, 8(22): 6178-6194. DOI:10.7150/thno.29569.

[11] MAI B, WANG X, LIU Q, *et al*. The application of DVDMS as a sensitizing agent for sono-/photo-therapy[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 19. DOI: 10.3389/fphar.2020.00019.

[12] TAN X, LUO S, WANG D, *et al*. A NIR heptamethine dye with intrinsic cancer targeting, imaging and photosensitizing properties[J]. Biomaterials, 2012, 33(7): 2230-2239. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.11.081.

[13] YUAN A, WU J, TANG X, *et al*. Application of near-infrared dyes for tumor imaging, photothermal, and photodynamic therapies[J]. J Pharm Sci, 2013, 102(1): 6-28. DOI:10.1002/jps.23356.

[14] JIANG C, CHENG H, YUAN A, *et al*. Hydrophobic IR780 encapsulated in biodegradable human serum albumin nanoparticles for photothermal and photodynamic therapy[J]. Acta Biomater, 2015, 14: 61-69. DOI:10.1016/j.actbio.2014.11.041.

[15] 何雨蓓,郝兰,李倩茹,等. 基于酞菁铁的靶向乳腺癌纳米粒多模态成像和光热效应的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(8): 772-782. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201911260.
HE Y B, HAO L, LI Q R, *et al*. Multimodal imaging and photothermal effect of targeted breast cancer nanoparticles based on iron phthalocyanine[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(8): 772-782. DOI: 10.16016/ J.1000-5404.201911260.

[16] MAEDA H, NAKAMURA H, FANG J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging *in vivo*[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(1): 71-79. DOI:10.1016/j.addr.2012.10.002.

[17] YANG W, XU H T, LIU Q H, *et al*. 5-Aminolevulinic acid hydrochloride loaded microbubbles-mediated sonodynamic therapy in pancreatic cancer cells[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2020, 48(1): 1178-1188. DOI: 10.1080/21691401.2020.1813743.

[18] PAN X, WANG H, WANG S, *et al*. Sonodynamic therapy (SDT): a novel strategy for cancer nanotheranostics[J]. Sci China Life Sci, 2018, 61(4): 415-426. DOI: 10.1007/s11427-017-9262-x.

(**收稿**:2020-11-25;**修回**:2020-12-23)

(编辑 栾 嘉)