DOI:10.16016/j.1000-5404.202012046

基于乏氧环境的生物靶向载药纳米粒诊疗乳腺癌的实验研究

王 璐[1],蒋富杰[1],杨海燕[1],王狄森[1],汪瑶台[1],唐 瑜[1],王 琦[1],邹建中[1,2] 400016 重庆,超声医学工程国家重点实验室,重庆医科大学生物医学工程学院[1];400016 重庆,重庆市生物医学工程学重点实验室[2]

[摘要] **目的** 探讨生物靶向载药纳米粒基于乏氧微环境诊疗乳腺癌的效果。**方法** 采用薄膜水化法制备载全氟己烷(perfluorohexanes,PFH)和替拉扎明(tirapazamine,TPZ)的 LPT 纳米粒。培养双歧杆菌,检测基本表征。利用静电吸附法连接菌和纳米粒以制备生物靶向载药纳米粒,激光共聚焦、流式细胞术检测二者连接情况。超声诊断仪、MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]法、流式细胞术检测纳米粒经 HIFU(high-intensity focused ultrasound)辐照后体外超声成像以及杀伤乳腺癌细胞效果;组织匀浆法检测双歧杆菌靶向肿瘤能力,活体荧光成像观察纳米粒靶向肿瘤情况。建立 4T1 乳腺癌小鼠模型,随机分为靶向组和非靶向组($n=3$)观察纳米粒体内超声成像效果;体内治疗时随机分空白对照组、PBS+HIFU 组、LPT+HIFU 组、LPT+双歧杆菌+HIFU 组($n=3$),记录小鼠体质量和肿瘤体积变化,14 d 后行 HE 染色。**结果** 成功制备生物靶向载药纳米粒。LPT 纳米粒粒径(218.93±6.56)nm、电位(55.00±4.97)mV,双歧杆菌电位(-28.10±7.52)mV,二者连接率为(99.04±0.40)%。HIFU 辐照后纳米粒具有较好超声成像效果。MTT 及流式细胞术检测结果显示与常氧组相比,纳米粒在乏氧条件下对乳腺癌细胞具有较好杀伤效果($P<0.05$)。组织匀浆结果验证双歧杆菌可靶向肿瘤组织,活体荧光成像显示纳米粒富集在肿瘤部位。靶向组纳米粒经 HIFU 辐照后实现了体内超声成像,比较各组肿瘤体积以及 HE 切片结果,LPT+双歧杆菌+HIFU 组抑瘤效果最明显($P<0.05$)。**结论** 基于乏氧微环境的生物靶向载药纳米粒能有效诊疗乳腺癌,为乳腺癌诊疗一体提供新思路。

[关键词] 乏氧;双歧杆菌;乏氧激活前药;高强度聚焦超声;肿瘤

[中图法分类号] R737.9; R944.9; R965 [文献标志码] A

Efficacy of bio-targeted drug-loaded nanoparticles on diagnosis and treatment for breast cancer based on hypoxic environment

WANG Lu[1], JIANG Fujie[1], YANG Haiyan[1], WANG Disen[1], WANG Yaotai[1], TANG Yu[1], WANG Qi[1], ZOU Jianzhong[1,2] [1]State Key Laboratory of Ultrasound in Medicine and Engineering, College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the efficacy of bio-targeted drug loaded nanoparticles for the diagnosis and treatment of breast cancer based on tumor hypoxia microenvironment. **Methods** Lipid nanoparticles loaded with perfluorohexane (PFH) and tirazamine (TPZ) were prepared by film hydration. Bifidobacteria were cultured and detected for basic characterizations. Then, the bacteria and nanoparticles were connected by electrostatic adsorption to prepare bio-targeted drug-loaded nanoparticles, and laser confocal microscopy and flow cytometry were used to detect the binding between them. Ultrasonic diagnostic imaging, MTT assay and flow cytometry were adopted to observe the *in vitro* imaging performance and killing effect on breast cancer cells after high-intensity focused ultrasound (HIFU) irradiation. Tissue homogenate was used to observe the targeting ability of bifidobacteria. *In vivo* fluorescence imaging was performed to monitor the targeting of nanoparticles. The 4T1 breast tumor-bearing mice were established and randomly divided into targeted group ($n=3$) and non-targeted group ($n=3$) to observe the ultrasound imaging

[通信作者] 邹建中,E-mail:zoujzh@cqmu.edu.cn

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/)

performance of nanoparticles. The tumor-bearing mice were randomly divided into blank control group, PBS+HIFU group, nonoparticles+HIFU group, and nonoparticles+ bifidobacterium+HIFU group ($n=3$ for each group). The body weight and tumor volume were recorded during treatment process, HE staining was performed 14 d later to observe the morphological changes of the tumor mass. **Results** Bio-targeted drug loaded nanoparticles were successfully prepared. The nanoparticles had an average size of 218.93±6.56 nm and a zeta potential of 55.00±4.97 mV, and the bifidobacterium had a potential of −28.10±7.52 mV. The connection rate of the nanoparticles and bacterium was (99.04±0.40)%. The nanoparticles showed better ultrasound imaging after HIFU irradiation. The results of MTT assay and flow cytometry showed that the nanoparticles exerted better killing effect on breast cancer cells under hypoxic condition than under normoxia condition ($P<0.05$). The results of tissue homogenate demonstrated that bifidobacteria showed good target ability. *In vivo* fluorescence imaging displayed that the nanoparticles were enriched around the tumor. *In vivo* ultrasound imaging was achieved in the targeted group after HIFU irradiation. Both the records of tumor volume and results of HE staining indicated that the nonoparticles+bifidobacterium+HIFU group got the best tumor inhibitory effect ($P<0.05$). **Conclusion** The bio-targeted drug loaded nanoparticles can effectively diagnose and treat breast cancer based on hypoxia microenvironment. Our study provides a new thought for the integration of tumor diagnosis and treatment.

[**Key words**] hypoxia; bifidobacterium; hypoxia-activated prodrugs; high-intensity focused ultrasound; tumor

Corresponding author: ZOU Jianzhong, E-mail: zoujzh@cqmu.edu.cn

肿瘤因具有乏氧、高渗透压、血管系统紊乱的微环境,故难以被治愈。其中乏氧环境不仅促进肿瘤的发生发展,还诱导肿瘤对化疗、放疗产生耐药性[1],影响肿瘤治疗效果。虽然乏氧区与肿瘤的不良预后相关,但乏氧区的存在促进了乏氧激活前药(hypoxia-activated prodrugs,HAPs)的发展,同时乏氧作为实体肿瘤的共同特征提示我们可以利用乏氧区进行靶向治疗。

双歧杆菌属于厌氧菌可靶向肿瘤乏氧区,其作为靶向载体已广泛应用于基因和纳米粒治疗相关研究[2-6]。与传统化疗药物不同,乏氧激活前药本身无毒性,在乏氧条件下发生还原反应生成具有抗肿瘤活性的药物[7-8]。基于肿瘤存在乏氧区而正常组织很少存在乏氧区的现象,本研究将靶向肿瘤乏氧区的双歧杆菌与乏氧激活前药相结合进行靶向治疗。此外,高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound,HIFU)作为非侵入性治疗实体肿瘤的技术,除消融肿瘤外还可促进药物定点释放,提高治疗的有效性和安全性[9-13],而全氟己烷(PFH,perfluorohexanes)作为相变材料,在HIFU作用下可发生液气相变,实现超声成像。因此,本实验将制备载乏氧激活前药替拉扎明(TPZ,tirapazamine)和PFH的阳离子脂质纳米粒(LPT纳米粒),通过静电吸附法与双歧杆菌连接,验证纳米粒靶向肿瘤能力、体内超声成像和治疗乳腺癌的效果。

1 材料与方法

1.1 主要材料

二棕榈酰基卵磷脂(DPPC,美国 Avanti 公司)、二硬脂酰基磷脂酰基乙醇胺-聚乙二醇-氨基(DSPE-PEG2000-Amine,美国 Avanti 公司)、胆固醇盐酸盐(DC-CHOL,美国 Avanti 公司)、全氟己烷(PFH,上海麦克林生化科技有限公司)、替拉扎明(TPZ,美国 Sigma 公司)、三氯甲烷(重庆川东化工集团)、MTT(美国 Sigma 公司)、琼脂糖凝胶粉(美国 Sigma 公司)、RPMI-1640 培养基(Gibco 公司)、胎牛血清(依科赛公司)、厌氧产气袋(日本三菱瓦斯化学株式会社),MRS 肉汤培养基(青岛海博生物科技有限公司)、钙黄绿素(CAM,日本同仁化学有限公司)、碘化丙啶(PI,日本同仁化学有限公司)。

1.2 主要仪器

旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、声震仪(美国 Sonic 公司)、粒径分析仪(英国 Malvern 公司)、光学显微镜(日本 Olympus 公司)、激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司)、流式细胞仪(美国 Beckman 公司)、JC200 型聚焦超声肿瘤治疗系统(重庆海扶医疗科技股份有限公司)、My LabClassC Advanced 超声诊断仪(意大利百胜集团)、LB983 活体荧光成像仪(德国 Berthold 公司)、Nanodrop2000 紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 制备 LPT 纳米粒及表征检测 按质量比 6:2:2 精确称取 DPPC、DSPE-PEG2000-Amine、DC-CHOL 并溶于三氯甲烷,旋转蒸发仪减压蒸发去除三

氯甲烷形成脂质薄膜,加入 TPZ 水溶液充分水化后逐滴加入 PFH,冰浴条件下声震均质乳化(100 W,5 min),去离子水洗涤、低温离心(6 100×g,5 min)3 次,完成 LPT 阳离子纳米粒的制备。通过 Malvern 粒径仪检测粒径及表面电位,透射电镜观察纳米粒形态和结构,紫外分光光度计检测药物吸光度并计算纳米粒的包封率、载药率。

1.3.2 培养双歧杆菌及表征检测 采用厌氧产气袋-缺氧密闭系统营造乏氧环境,同时使用厌氧指示剂。接种双歧杆菌(ATCC29521)于 MRS 肉汤,37 ℃厌氧条件下培养 18 h,低温离心收集双歧杆菌并洗涤 3 次,加入 PBS 重悬至浓度为 1×10^6 CFU/mL 备用。革兰染色后于光学显微镜下观察形态,稀释检测表面电位。

1.3.3 双歧杆菌与 LPT 纳米粒体外连接 制备 DiI 染料标记的 LPT 阳离子纳米粒(靶向组)和非阳离子纳米粒(非靶向组),FITC 染料标记双歧杆菌,以 1∶10 的体积比混匀纳米粒和双歧杆菌,通过静电吸附法连接,静置备用。共聚焦显微镜观察连接情况,流式细胞仪检测连接率。

1.3.4 聚焦超声辐照后纳米粒超声成像及药物释放实验 光镜下观察纳米粒经 HIFU(120 W,5 s)辐照前后相变情况,并将辐照后的纳米粒加入琼脂凝胶体膜中,观察超声成像效果。设置对照组和 HIFU 辐照组,将 LPT 纳米粒悬液随机等量装在透析袋中,再置于缓冲介质,其中实验组在 5 h 采样结束后立即用 HIFU 辐照,两组分别于 5、10、15、25、35、45 h 取样,紫外分光光度计检测 460 nm 处吸光度值,计算并绘制释药曲线。

1.3.5 MTT 法检测乏氧/常氧条件下纳米粒对 4T1 乳腺癌细胞活性的影响 取对数生长期的 4T1 乳腺癌细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,培养 12 h。设置常氧组和乏氧组,两组都加入经 HIFU 辐照后不同浓度(0、0.025、0.050、0.100、0.200 mg/mL)的纳米粒,分别于常氧和乏氧环境下继续培养 24 h 后加入 20 μL MTT(5 mg/mL)再孵育 4 h,最后加入 DMSO 震荡 10 min,酶标仪检测 570 nm 处吸光度值,计算细胞存活率。

1.3.6 流式细胞术检测乳腺癌细胞凋亡情况 取 4T1 乳腺癌细胞(上海富衡生物科技有限公司)接种于六孔板培养 12 h,设置常氧组(对照组)、乏氧组(不加纳米粒处理)、常氧+纳米粒组、乏氧+纳米粒组,后两组加入经 HIFU 辐照后的 LPT 纳米粒,继续培养 24 h 后送检。

1.3.7 双歧杆菌体内靶向实验 培养 4T1 乳腺癌细胞,选取 4~6 周龄雌性 BALB/C 小鼠,体质量 18~22 g,由重庆医科大学动物实验中心提供[许可证号:SYXK(渝)2018-0003],建立荷瘤鼠模型(n=3)。连续 3 天经尾静脉注射双歧杆菌(1×10^6 CFU/mL,200 μL/次,1 次/d),注射后第 7 天处死荷瘤鼠,无菌条件下取心、肝、脾、肺、肾、肿瘤分别做组织匀浆,涂布于 BL 琼脂平板上 37 ℃厌氧培养,48 h 后观察菌落生长情况。

1.3.8 生物靶向载药纳米粒体内靶向实验 选取 4~6 周龄 BALB/C 雌鼠 3 只,建立 4T1 荷瘤鼠模型。制备 DiR 荧光染料标记的纳米粒,对小鼠肿瘤部位进行预脱毛处理,经尾静脉注射双歧杆菌和纳米粒,通过小动物活体荧光成像仪观察注射前以及注射后 2、8、24、32、48 h 小鼠体内纳米粒荧光分布情况,记录肿瘤部位荧光强度变化趋势,处死荷瘤鼠取重要器官及肿瘤进行离体荧光拍照。

1.3.9 体内超声成像 建立 4T1 荷瘤鼠模型 6 只,随机分为靶向组(双歧杆菌+LPT 纳米粒组)和非靶向组(LPT 纳米粒组)。靶向组经尾静脉注射双歧杆菌和纳米粒,非靶向组仅注射纳米粒。于注射后 32 h 进行 HIFU 辐照(120 W,5s),利用超声诊断仪采集辐照前后超声图像,并用 DFY 软件定量分析超声信号强度。

1.3.10 纳米粒体内治疗实验 建立 4T1 荷瘤鼠模型(12 只),随机分为 4 组:空白对照组、PBS+HIFU 组、LPT+HIFU 组和 LPT+双歧杆菌+HIFU 组,各组分别经尾静脉注射 PBS、纳米粒悬液 200 μL,后 3 组于注射后 32 h 进行 HIFU 辐照(120 W,5 s)。每 2 天记录荷瘤鼠体质量以及肿瘤体积变化,于第 14 天处死小鼠并剥离肿瘤,固定、包埋后进行 HE 染色,观察肿瘤组织病理变化。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,满足正态性、方差齐性时采用两独立样本 t 检验,不满足时采用曼-惠特尼 U 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 LPT 纳米粒基本表征

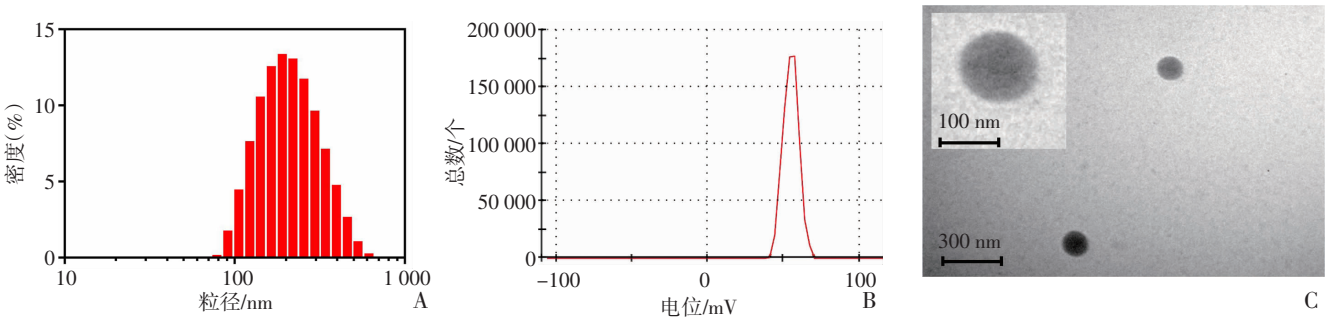
成功制备 LPT 纳米粒,粒径为(218.93±6.56)nm(图 1A),电位为(55.00±4.97)mV(图 1B),透射电镜下观察到 LPT 纳米粒呈规则球形(图 1C),大小均一。经紫外分光光度检测,TPZ 标准吸收曲线回归方程为:$Y=3.9071\times X+0.0076$,$R^2=0.9988$,由此计算 TPZ 包封率为 43.40%、载药率为 3.97%。

2.2 双歧杆菌基本表征

双歧杆菌经革兰染色后呈蓝紫色的 Y 字、棍棒状(图 2A),表面电位为(-28.10±7.52)mV(图 2B),呈负电位。

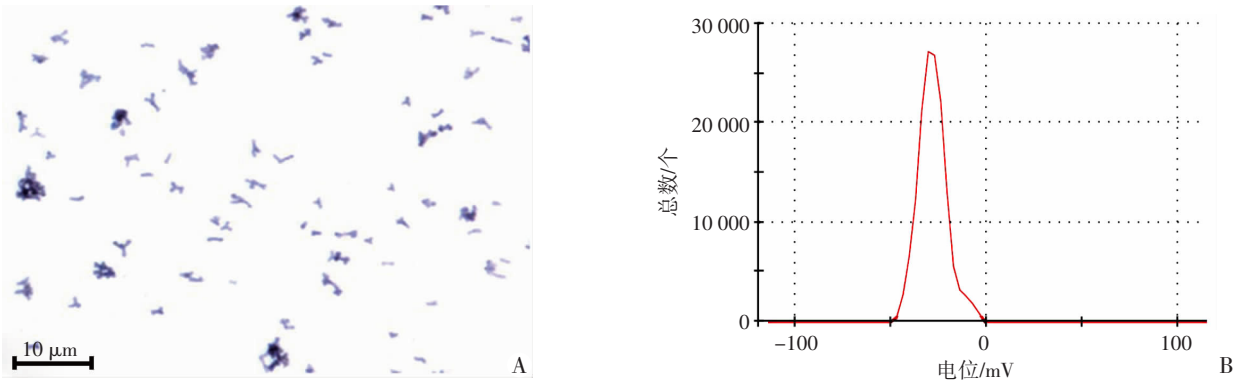
2.3　双歧杆菌与 LPT 纳米粒体外连接情况

共聚焦显微镜下,经染料标记的双歧杆菌和纳米粒分别呈绿色和红色。非靶向组纳米粒与菌散在分布,靶向组中带负电荷的双歧杆菌与带正电荷的纳米粒因相互吸附荧光融合而呈黄色,表明 LPT 纳米粒与双歧杆菌成功连接(图 3A);流式细胞术结果显示实验组连接率为(99.04±0.40)%,对照组为(1.03±0.08)%,差异具有统计学意义(P<0.05,图 3B)。



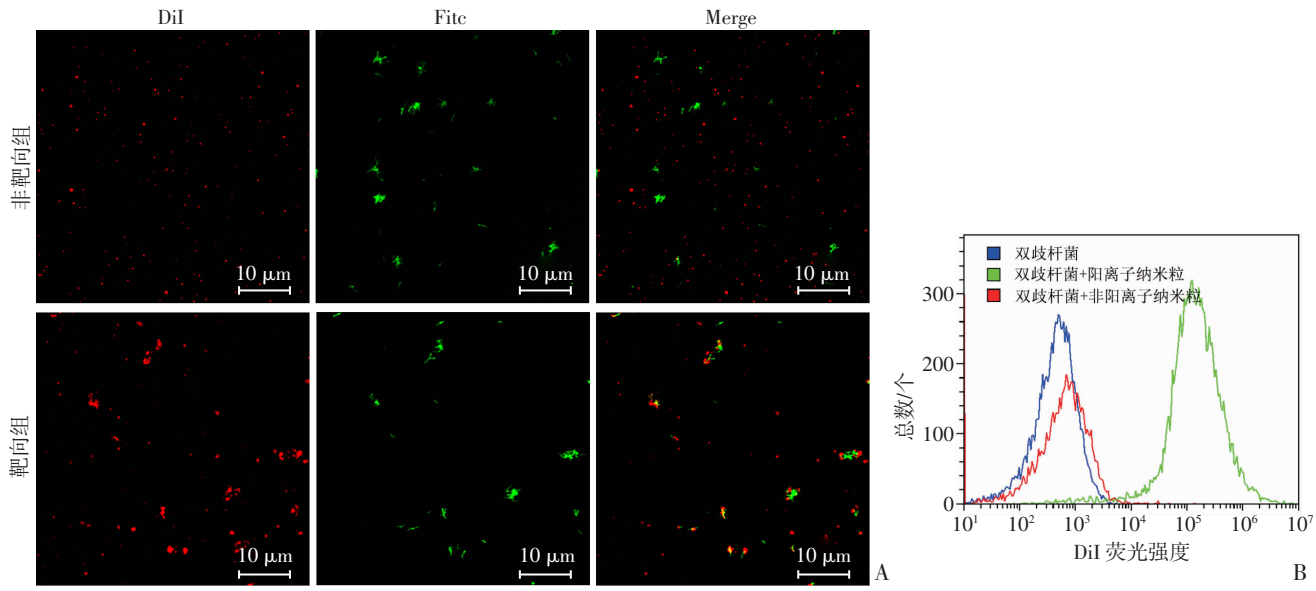
A:粒径图;B:电位图;C:透射电镜图

图 1　LPT 纳米粒粒径、表面电位及透射电镜检测结果



A:双歧杆菌革兰染色光镜图;B:电位图

图 2　双歧杆菌革兰染色光镜图及表面电位检测结果



A:激光共聚焦图(红色标记纳米粒,绿色标记双歧杆菌);B:流式细胞仪检测结果

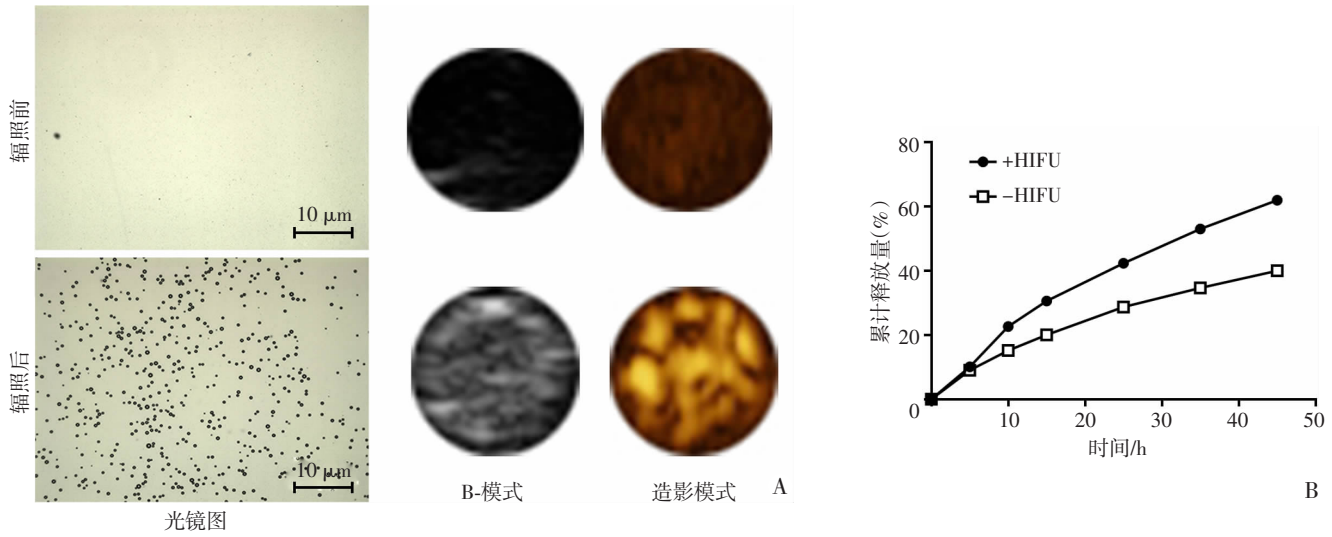
图 3　纳米粒及双歧杆菌连接情况

2.4　聚焦超声辐照后纳米粒超声成像及药物释放曲线

LPT 纳米粒经 HIFU 辐照后发生液气相变形成微泡,DFY 软件分析 B-模式辐照前后声强差值为(64.89±5.48)dB,造影模式辐照前后声强差值为(63.14±8.40)dB,辐照后超声回声显著增强(图 4A),辐照前后差异具有统计学意义(P<0.05)。药物释放曲线表明实验组在第五小时经 HIFU 辐照后释药速率提高,比较后面相同时间点药物累计释放量,HIFU 辐照组释放量更多(图 4B)。

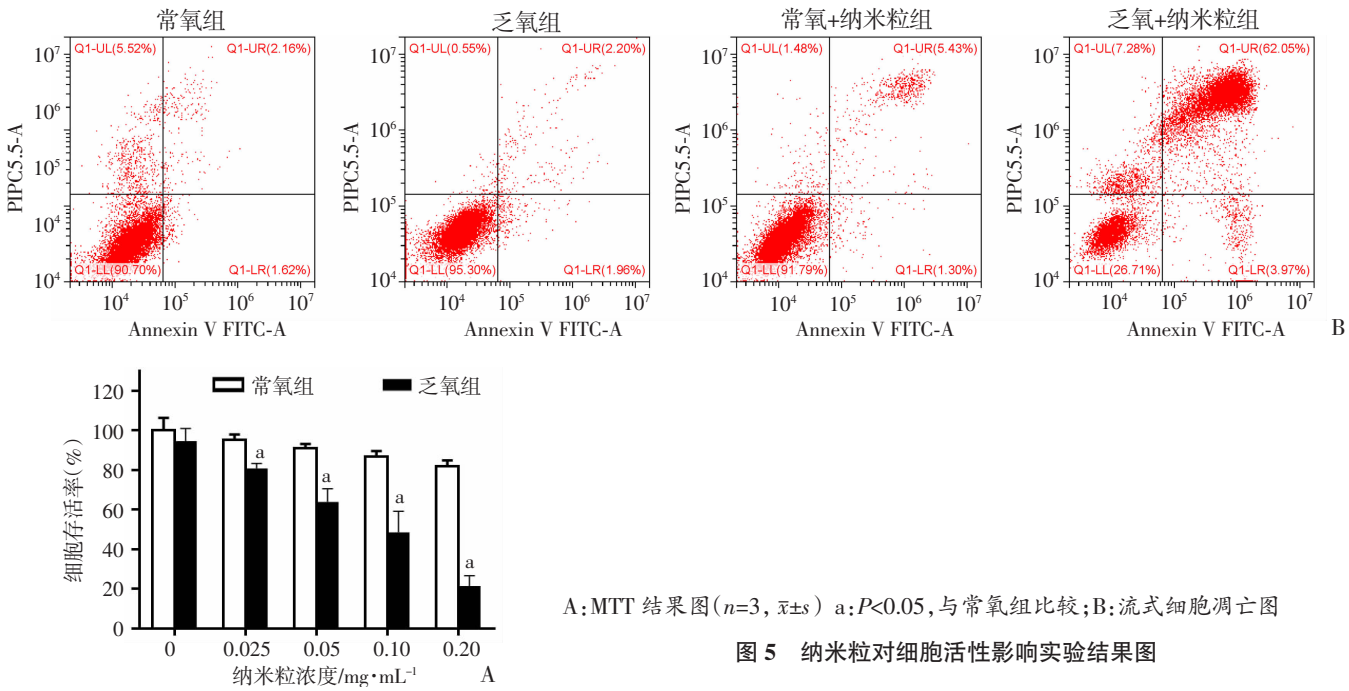
2.5　纳米粒对细胞活性影响

MTT 实验结果显示(图 5A),常氧组经纳米粒处理的细胞存活率都在 80%以上,且各浓度组比较均无统计学意义,表明常氧条件下纳米粒本身具有一定的稳定性和安全性。乏氧组细胞存活率随纳米粒浓度升高而降低,在相同浓度纳米粒处理条件下,与常氧组比较都有统计学意义(P<0.05)。当纳米粒浓度为 0.2 mg/mL 时,细胞存活率约为(21.44±0.51)%。细胞流式结果(图 5B)显示不经纳米粒处理的常氧组和乏氧组细胞凋亡率分别为(4.69±1.8)%、(4.75±2.2)%,凋亡率均低于 5%,比较两组结果差异无统计学意义(P>0.05),而常氧+纳米粒组和乏氧+纳米粒组细胞凋亡率分别为(6.67±2.11)%、(66.10±4.60)%,差异具有统计学意义(P<0.05),比较乏氧组和乏氧组+纳米粒组细胞凋亡结果,差异具备统计学意义(P<0.05)。



A:纳米粒液气相变及超声成像图;B:纳米粒药物释放曲线(n=3,$\bar{x}\pm s$)

图 4　HIFU 辐照后纳米粒液气相变及释药情况



A:MTT 结果图(n=3, $\bar{x}\pm s$) a:P<0.05,与常氧组比较;B:流式细胞凋亡图

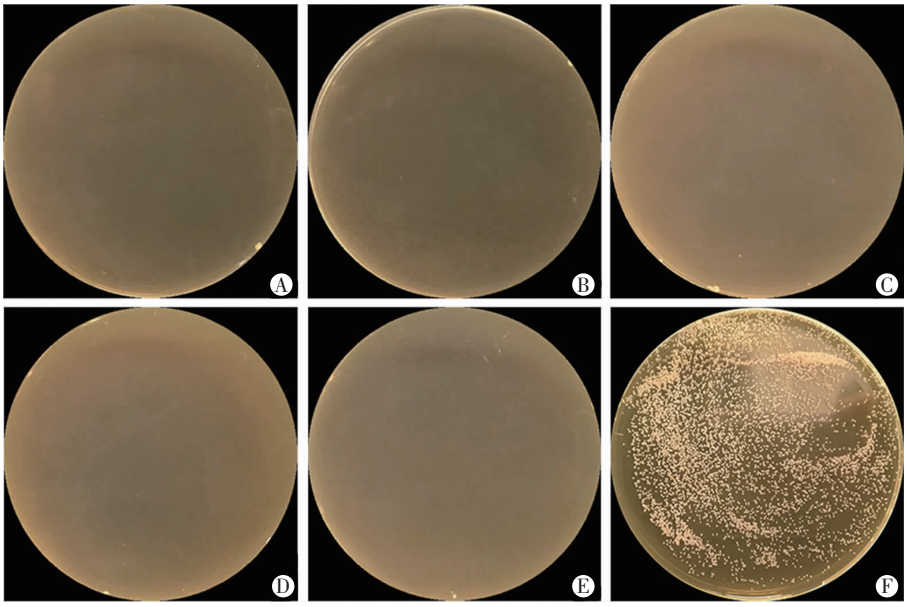
图 5　纳米粒对细胞活性影响实验结果图

2.6　双歧杆菌靶向肿瘤结果

荷瘤鼠组织匀浆结果显示(图6),心、肝、脾、肺、肾组织的BL琼脂平板未见或仅可少见菌落生长,肿瘤组织的BL琼脂平板上可见大量双歧杆菌菌落生长。说明双歧杆菌具备肿瘤靶向性,可通过静脉注射定植于瘤体内。

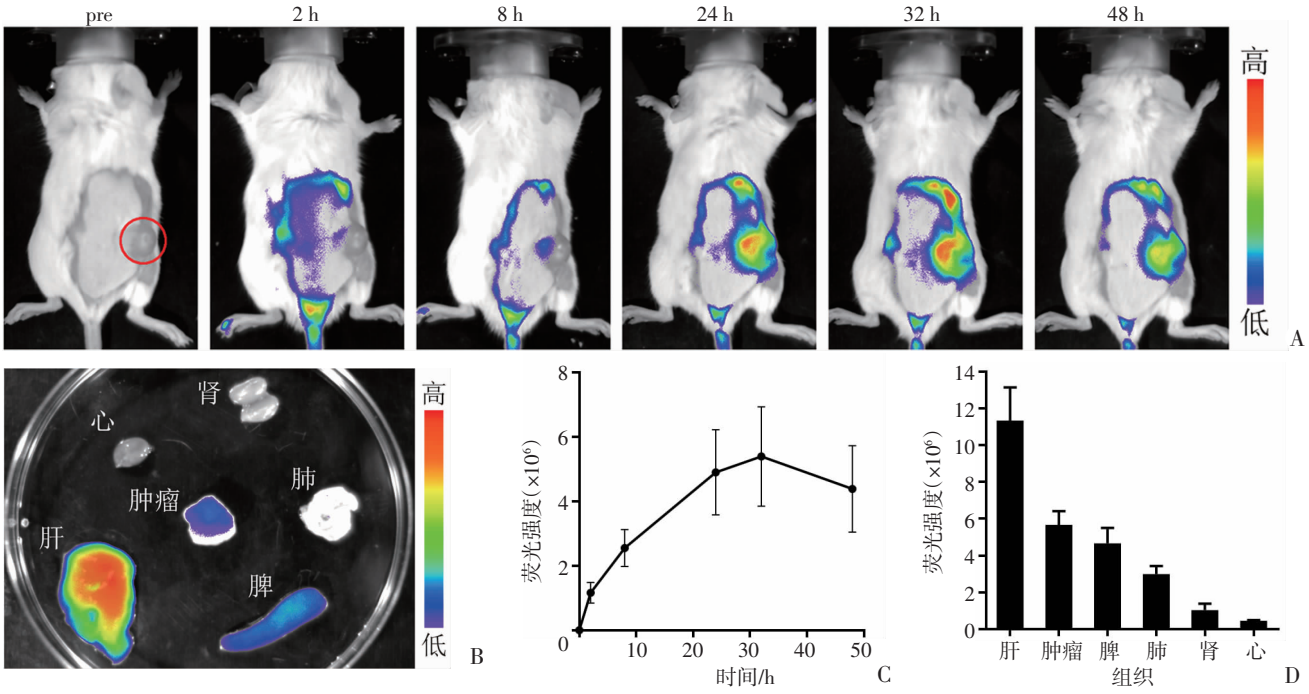
2.7　纳米粒靶向肿瘤结果

活体荧光成像实验结果显示DiR标记的纳米粒经尾静脉注射后2 h已经开始聚集到肿瘤部位,随时间延长肿瘤部位荧光信号增强,表明纳米粒在肿瘤部位聚集量逐渐增加,约32 h荧光信号强度到达高峰值,在注射后48 h,仍可观察到纳米粒滞留在肿瘤部位(图7A、C),小鼠重要器官及肿瘤离体组织可观察到纳米粒荧光分布(图7B、D)。



A:心;B:肝;C:脾;D:肺;E:肾;F:肿瘤组织

图6　小鼠重要脏器及肿瘤组织匀浆观察双歧杆菌定植情况



A:不同时间点纳米粒在肿瘤部位分布情况(红圈标注为肿瘤部位);B:离体组织荧光成像图;C:肿瘤部位荧光强度变化趋势图($n=3$,$\bar{x}\pm s$);D:荷瘤鼠离体组织荧光强度图($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

图7　荷瘤鼠活体荧光成像图

2.8 体内超声成像

实验结果显示(图8A),两组荷瘤鼠在HIFU辐照前肿瘤B-模式/造影模式图像均无明显回声信号,两组灰度值差异无统计学意义($P>0.05$)。HIFU辐照后,靶向组B-模式/造影模式图像回声信号明显提高,B-模式回声信号强度为(43.70±4.04)dB,造影模式回声信号强度为(54.70±4.16)dB,信号强度较辐照前以及非靶向组均具有统计学差异($P<0.05$),非靶向组辐照前后差异无统计学意义($P>0.05$,图8B、C)。

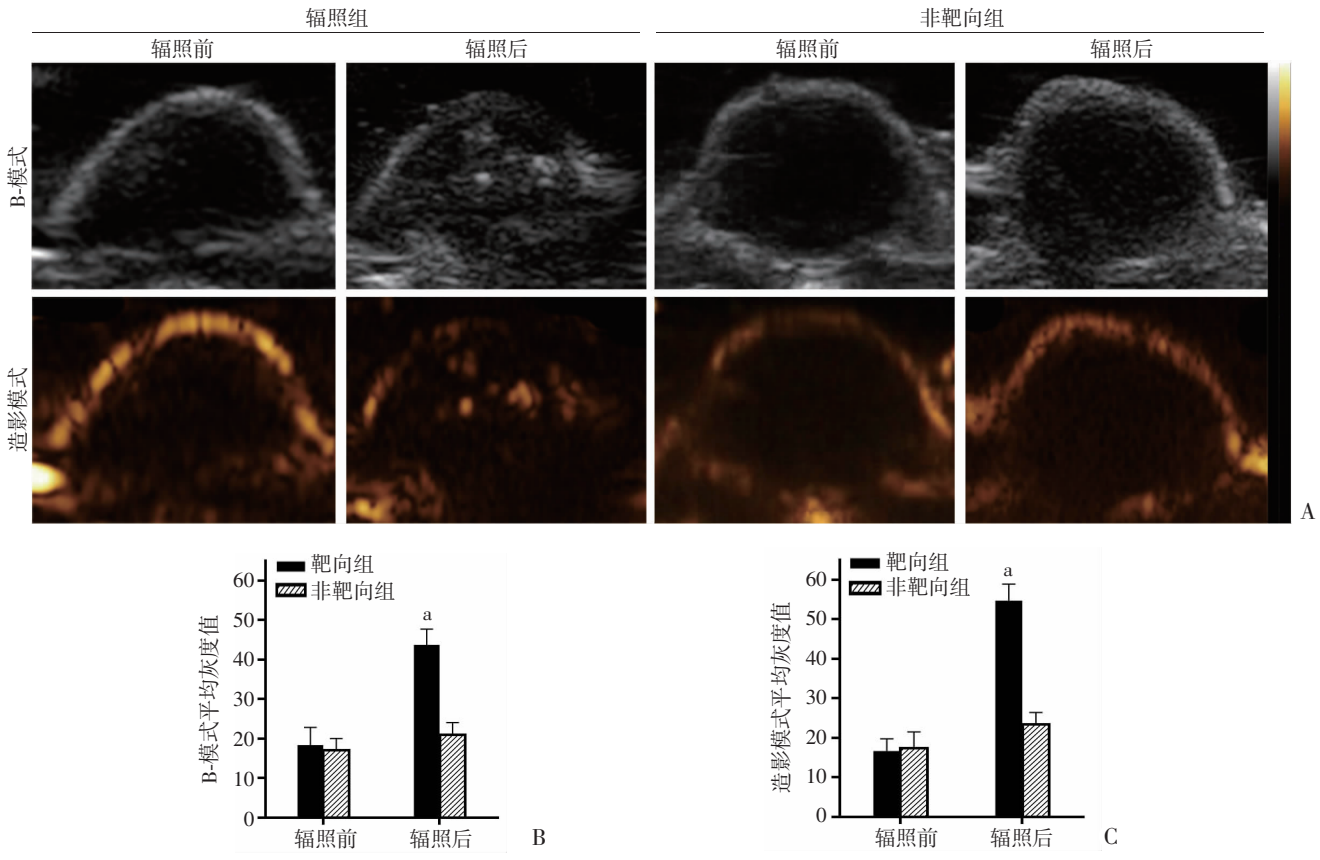
2.9 纳米粒体内治疗实验

荷瘤鼠肿瘤体积变化图显示(图9A),PBS+HIFU组对肿瘤可产生抑制效果,LPT+HIFU组比PBS+HIFU组对肿瘤抑制效果好($P<0.05$)。LPT+菌+HIFU组对肿瘤抑制效果最好($P<0.05$)。各组荷瘤鼠体质量结果显示均无明显变化(图9B)。肿瘤组织HE染色结果表明(图9C),空白对照组肿瘤细胞形态完整、核蓝染,无明显变化。HIFU干预组开始出现不同程度核固缩、核碎裂,其中LPT+双歧杆菌+HIFU组可见大量核溶解,表现为无结构片状红染。

3 讨论

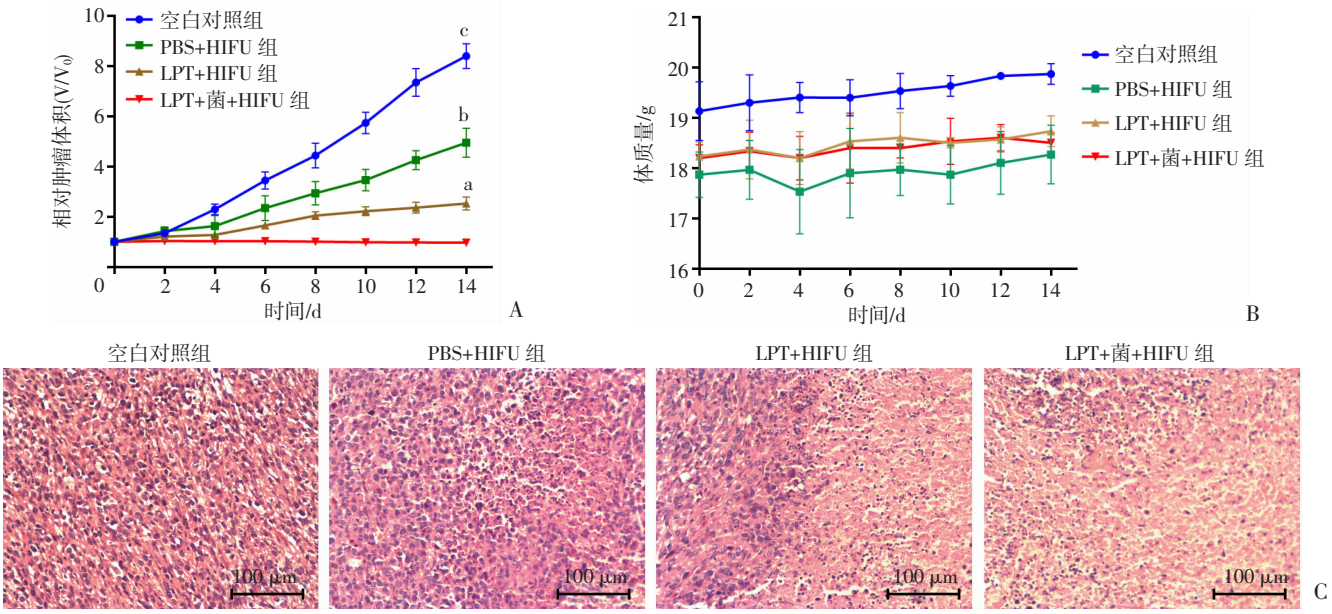
乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤疾病,用于治疗乳腺癌的常规方法包括手术治疗、放疗和化疗等[14-15],然而化疗药物运载效率低,易引起全身细胞毒性,由此促进了纳米技术和靶向治疗的发展[16]。但目前常用的靶向治疗需要特定靶点,缺乏普遍性。乏氧区作为实体肿瘤的共同特征之一,为肿瘤的靶向治疗提供新的思路。本文就基于乏氧环境,利用肿瘤靶向细菌和乏氧激活前药诊疗乳腺癌。

本研究首先制备了LPT阳离子纳米粒,纳米粒大小均一,呈正电位,因此可利用静电吸附法连接表面呈负电位的双歧杆菌。共聚焦和流式检测结果表明双歧杆菌与LPT纳米粒具有较高连接率,可有效连接。双歧杆菌为严格厌氧菌,乏氧区的存在有利于厌氧菌生存是双歧杆菌靶向肿瘤的基础,因此组织匀浆结果显示仅肿瘤组织匀浆培养后可长出大量双歧杆菌菌落,验证了双歧杆菌的靶向性。此外,双歧杆菌定植肿瘤



A:体内超声成像图;B:B-模式灰度值定量分析图($n=3,\bar{x}\pm s$);C:造影模式灰度值定量分析图($n=3,\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与非靶向组比较

图8 体内注射纳米粒后靶向组及非靶向组HIFU辐照前后超声成像图(A)及定量分析(B、C)



A:荷瘤鼠相对肿瘤体积变化图($n=3,\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与 LPT+菌+HIFU 组比较; b:$P<0.05$,与 LPT+HIFU 组比较; c:$P<0.05$,与 PBS+HIFU 组比较;B:荷瘤鼠体质量变化图($n=3,\bar{x}\pm s$);C:肿瘤组织 HE 染色图

图 9 纳米粒体内治疗效果图

后还可在肿瘤组织增殖,较单纯被动靶向更有优势[17-18]。通过活体荧光成像观察到纳米粒聚集在肿瘤组织,且在 48 h 后仍有滞留,说明经双歧杆菌引导纳米粒可靶向肿瘤,提高了纳米粒在肿瘤部位的局部浓度和滞留时间。制备的 LPT 纳米粒包载了 PFH 和 TPZ,其中相变材料 PFH 经 HIFU 辐照后发生液气相变生成微泡,可进行超声成像,为肿瘤早期诊断以及介导体内治疗奠定基础。HIFU 辐照同时还促进纳米粒释放 TPZ,TPZ 是典型的乏氧激活前药,在乏氧条件下可发生还原反应生成自由基,杀伤肿瘤细胞[19-20]。MTT 实验、流式细胞术检测结果表明纳米粒在乏氧条件下对肿瘤细胞产生了显著杀伤作用,因此可利用肿瘤组织与正常组织含氧量的差别,结合纳米粒的靶向性以及超声成像,使纳米粒发挥抗肿瘤效果的同时减少对正常组织的副作用。体内治疗结果表明,单纯 HIFU 辐照组在治疗后初期具有抑瘤效果但后期肿瘤仍持续生长,可能是辐照后残留肿瘤组织复发导致,而 LPT+双歧杆菌+HIFU 组结合菌靶以及抗癌药物,可进一步实现抑瘤作用,肿瘤体积无增长,实现了更好的治疗效果。

综上,本研究基于肿瘤乏氧微环境制备的生物靶向载药纳米粒可有效诊疗乳腺癌。但现研究处于初级阶段,后续可利用纳米技术包载其他成像材料以制备多模态诊疗一体化探针,用于介导肿瘤精准治疗,还可通过合理设计纳米传递系统,将肿瘤乏氧微环境扩展到其他疾病的乏氧微环境,用于其余疾病治疗。

参考文献:

[1] SHANNON A M, BOUCHIER-HAYES D J, CONDRON C M, *et al*. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies[J]. Cancer Treat Rev, 2003 Aug; 29(4): 297-307. DOI: 10.1016/s0305-7372(03)00003-3.

[2] XU D, ZOUW J, LUO Y, *et al*. Feasibility between bifidobacteria targeting and changes in the acoustic environment of tumor tissue for synergistic HIFU[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 7772. DOI: 10.1038/s41598-020-64661-6.

[3] GAO X, ZOU W, JIANG B L, *et al*. Experimental study of retention on the combination of bifidobacterium with high-intensity focused ultrasound (HIFU) synergistic substance in tumor tissues [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6423. DOI: 10.1038/s41598-019-42832-4.

[4] LUO Y, XU D, GAO X, *et al*. Nanoparticles conjugated with bacteria targeting tumors for precision imaging and therapy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 514(4): 1147-1153. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.05.074.

[5] WANG Y T, CHEN C, LUO Y, *et al*. Experimental study of tumor therapy mediated by multimodal imaging based on a biological targeting synergistic agent [J]. Int J Nanomed, 2020, 15(1871-88). DOI: 10.2147/IJN.S238398.

[6] CHEN C, WANGY, TANG Y, *et al*. Bifidobacterium-mediated high-intensity focused ultrasound for solid tumor therapy: comparison of two nanoparticle delivery methods [J]. Int J Hyperthermia, 2020, 37(1): 870-878. DOI: 10.1080/02656736.2020.1791365.

[7] PHILLIPSR M. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2016, 77(3): 441-457. DOI: 10.1007/s00280-015-2920-7.

[8] HONGB J, KIM J, JEONG H, *et al*. Tumor hypoxia and reoxygenation: the Yin and Yang for radiotherapy[J]. Radiat Oncol J, 2016, 34(4): 239-249. DOI: 10.3857/roj.2016.02012.

[9] OERLEMANS C, DECKERS R, STORM G, *et al*. Evidence for a new mechanism behind HIFU-triggered release from liposomes[J]. J Control Release, 2013, 168(3): 327-333. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.03.019.

[10] XIA H, ZHAO Y, TONG R. Ultrasound-mediated polymeric micelle drug delivery[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 880: 365-384. DOI: 10.1007/978-3-319-22536-4_20.

[11] ARORA J S, MURAD H Y, ASHE S, *et al*. Ablative focused ultrasound synergistically enhances thermally triggered chemotherapy for prostate cancer *in vitro* [J]. Mol Pharm, 2016 Sep 6;13(9): 3080-3090. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00216.

[12] ZHANG N, CAI X, GAO W, *et al*. A multifunctional theranostic nanoagent for dual-mode image-guided HIFU/chemosynergistic cancer therapy[J]. Theranostics, 2016, 6(3): 404-417. DOI: 10.7150/thno.13478.

[13] TANGH, GUO Y, PENG L, *et al*. In vivo targeted, responsive, and synergistic cancer nanotheranostics by magnetic resonance imaging-guided synergistic high-intensity focused ultrasound ablation and chemotherapy[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(18): 15428-15441. DOI: 10.1021/acsami.8b01967.

[14] ZOU M, LIY H, XIA S, *et al*. Knockdown of CAVEOLIN-1 sensitizes human basal-like triple-negative breast cancer cells to radiation[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(2): 778-791. DOI: 10.1159/000485291.

[15] GIORDANO L, GALLO F, PETRACCI E, *et al*. The ANDROMEDA prospective cohort study: predictive relue of combined criteria to tailor beast cancer screening and new opportunitres from crrculatng markers: Study protocol [J]. BMC Cancer, 2017, 22, 17(1): 785. DOI: 10.11861S12885-017-3784-5.

[16] BAHRAMI B, HOJJAT-FARSANGI M, MOHAMMADI H, *et al*. Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy[J]. Immunol Lett, 2017, 190: 64-83. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.07.015.

[17] ST JEAN A T, ZHANG M, FORBES N S. Bacterial therapies: completing the cancer treatment toolbox [J]. Curr Opin Biotechnol, 2008, 19(5): 511-517. DOI: 10.1016/j.copbio.2008.08.004.

[18] DUONGM T, QIN Y, YOU S H, *et al*. Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy [J]. Exp Mol Med, 2019, 51(12): 1-15. DOI: 10.1038/s12276-019-0297-0.

[19] YANG S, TANG Z, HU C, *et al*. Selectively potentiating hypoxia levels by combretastatin A4 nanomedicine: toward highly enhanced hypoxia-activated prodrug tirapazamine therapy for metastatic tumors[J]. Adv Mater, 2019, 31(11): e1805955. DOI: 10.1002/adma.201805955.

[20] WANG Y, XIE Y, LI J, *et al*. Tumor-penetrating nanoparticles for enhanced anticancer activity of combined photodynamic and hypoxia-activated therapy[J]. ACS Nano, 2017, 11(2): 2227-2238. DOI: 10.1021/acsnano.6b08731.

(收稿:2020-12-05;修回:2021-01-24)

(编辑 栾 嘉)