DOI:10.16016/j.1000-5404.202105108

氧化铱纳米载药复合物的制备及其用于肿瘤声动力-化疗协同治疗的研究

邹卫娟[1,2],郝俊年[2],吴建荣[2],郑元义[1,2] 400010 重庆,重庆医科大学超声分子影像重庆市重点实验室[1];200233 上海,上海交通大学附属第六人民医院,上海超声医学研究所[2]

[**摘要**] **目的** 制备氧化铱(iridium oxide,IrO_X)作为纳米声敏剂,用以负载化疗药物阿霉素(doxorubicin,DOX)后得到具有 pH 和超声辐照双响应的纳米载药复合物(IrO_X@DOX),验证其用于肿瘤声动力治疗(sonodynamic therapy,SDT)-化疗协同治疗肿瘤的效果。**方法** 采用热水解法制备 IrO_X 纳米颗粒,并负载 DOX。采用透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)、X 射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy,XPS)、紫外-可见分光光度计(ultraviolet-visible spectrophotometer,UV-vis)、Zeta 电位分析仪等手段对纳米颗粒的形貌及理化性质进行相关表征;采用 UV-Vis 和酶标仪考察载药量及药物释放行为;用电子顺磁共振波谱仪(lectron spin-resonance spectroscopy,ESR)定性评价其活性氧产生性能;激光共聚焦显微镜评价 IrO_X@DOX 在超声辐照下的细胞摄取行为;荧光显微镜和流式细胞仪探究细胞内活性氧产生;CCK-8 法及流式凋亡检测评价 IrO_X@DOX 的声动力治疗-化疗协同治疗效果。建立 Hepa1-6 肝癌裸鼠皮下移植瘤模型,并分为生理盐水组、IrO_X 组、IrO_X+US 组、IrO_X@DOX 组、IrO_X@DOX+US 组($n=3$),观察各组荷瘤鼠肿瘤的体积、超声造影成像结果与病理学变化,计算肿瘤体积抑制率评价其体内协同治疗效果。**结果** 成功制备 IrO_X 纳米颗粒,粒径大约为 5 nm。当 IrO_X 与 DOX 的比值为 4.0 时,载药量可达 18.7%;IrO_X@DOX 在 pH =7.4 时释放的 DOX 量不足 10%,证实了其良好的稳定性;pH=5.5 时,DOX 的累积释放量可达 39.9%。在超声辐照下释放量进一步增加达 69.9 %;ESR 和 UV-Vis 实验结果表明活性氧产量与辐照功率和时间呈正相关;激光共聚焦结果显示超声能促进细胞对 IrO_X@DOX 的摄取;细胞毒性实验表明,与单纯化疗组相比,协同治疗组存活率降至 19.4%,证明 IrO_X@DOX 在超声辐照下可以实现良好的 SDT-化疗协同治疗效果。动物实验表明与生理盐水组相比,IrO_X+US 组、IrO_X@DOX 组和 IrO_X@DOX+US 组的肿瘤抑制率分别为 27%、57%及 76%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。这与超声造影和 HE 染色结果一致。**结论** 成功制备了具有 pH 和超声辐照双重刺激响应的 IrO_X@DOX 纳米复合物,在超声辐照下可以实现 SDT-化疗协同治疗。

[**关键词**] 氧化铱;声动力治疗;化疗;协同治疗;肿瘤

[**中图法分类号**] R454.3; R730.58; R944.9 [**文献标志码**] A

Preparation of drug-loaded iridium oxidenanocomposites and its application in synergetic sonodynamic/chemotherapeutic therapy against cancer

ZOU Weijuan[1,2], HAO Junnian[2], WU Jianrong[2], ZHENG Yuanyi[1,2] [1]Chongqing Key Laboratory of Ultrasound Molecular Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Shanghai Institute of Ultrasound Medicine, Sixth People's Hospital affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200233, China

[**Abstract**] **Objective** To prepare iridium oxide (IrO_X) as a nano-sonosensitizer to load chemotherapy drug doxorubicin (DOX) in order to obtain nanocomposites IrO_X@DOX with dual response of pH/ultrasound (US) irradiation, and to verify its efficacy in sonodynamic therapy (SDT)-chemotherapy for

[**基金项目**] 国家自然科学基金委重点国际(地区)合作研究项目(81720108023);国家自然科学基金重点项目(82030050);癌基因及相关基因国家重点实验室开放项目(KF2104-93#)

[**通信作者**] 郑元义,E-mail:zhengyuanyi@163.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/)

tumor treatment. **Methods** IrO_X nanoparticles were prepared by thermal hydrolysis and then loaded with DOX. The morphological, chemical and physical properties of the nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy (TEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-Vis) and Zeta potential analyzer. The drug loading efficiency and drug release behavior were determined with UV-vis spectrometry and ELISA. The generation of reactive oxygen species (ROS) by IrO_X@DOX nanoparticles was evaluated usingelectron spin-resonance spectroscopy (ESR). The uptake of IrO_X@DOX by 4T1 cells under ultrasonic irradiation was evaluated with laser confocal scanning microscopy (LCSM), and the level of intracellular ROS was investigated using fluorescence microscopy and flow cytometry. The synergistic efficacy of IrO_X@DOX in SDT-chemotherapy against 4T1 cells was evaluated by CCK-8 assay and flow cytometry. In addition, the Hepa1-6 xenograft tumor model in nude mice was built and divided into 5 groups ($n=3$ in each group) as follows: saline, IrO_X, IrO_X+US, IrO_X@DOX, and IrO_X@DOX+US. The tumor volume, contrast-enhanced US imaging and pathological changes of each group were observed, and the inhibitory rate of tumor volume was calculated to evaluate the effect of synergistic therapy *in vivo*. **Results** IrO_X nanoparticles were successfully prepared, at a diameter of about 5.0 nm, and when the ratio of IrO_X to DOX was 4.0, the drug loading reached 18.7%. Prepared IrO_X@DOX released less than 10% of DOX at pH 7.4, which confirmed its good stability, while the cumulative release of DOX reached 39.9% at pH 5.5, and further increased to 69.9% under US irradiation. Both ESR and UV-vis experiments demonstrated that ROS production was positively correlated with irradiation power and time. Meanwhile, LCSM showed that US promoted the uptake of IrO_X@DOX by tumor cells. *In vitro* cytotoxicity experiments indicated the survival rate of tumor cells in the synergistic treatment group (IrO_X@DOX+US) was reduced to 19.4%, significantly lower than that of the chemotherapy group alone ($P<0.05$), which proved that IrO_X@DOX nanocomposites achieved an excellent synergistic effect of SDT-chemotherapy under ultrasound irradiation. Furthermore, *in vivo* experiments showed that as compared with saline group, the tumor-inhibiting rate of IrO_X+US, IrO_X@DOX and IrO_X@DOX+US groups were 27%, 57% and 76%, respectively, indicating significant difference ($P<0.05$), and this was consistent with contrast US imaging and H&E staining results. **Conclusion** IrO_X@DOX nanocomposites with dual stimulation response of pH and US irradiation are successfully developed, and the synergistic treatment of SDT-chemotherapy can be achieved under US irradiation.

[**Key words**] iridium oxide; sonodynamic therapy; chemotherapy; synergistic therapy; tumor

Supported by the Key Project of International(Regional) Cooperation and Exchanges of National Natural Science Foundation of China (81720108023), the Key Program of National Natural Science Foundation of China (82030050), and the Open Project of State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes (KF2104-93#). Corresponding author: ZHENG Yuanyi, E-mail: zhengyuanyi@163.com

恶性肿瘤是威胁人类健康的重大疾病之一,已成为目前全球性的健康挑战[1]。尽管肿瘤治疗已经取得了一些突破性的进展,但患者病死率一直居高不下。化疗仍然是临床上肿瘤治疗最常用的方式,然而化疗药物的不良反应严重影响患者的生存质量[2]。因此,急需开发新的治疗策略来解决这个难题。近年来,基于纳米材料的协同治疗模式引起了科研工作者的广泛关注。与传统的化学疗法和放射疗法相比,通过纳米材料实现几种治疗模式联合而产生协同效应,可以达到疗效高且不良反应小的目的[3-6],为肿瘤的特异性治疗带来了曙光。

声动力学疗法(sonodynamic therapy,SDT)作为一种新兴的非侵入性的治疗手段,近年来得到迅速发展。这种治疗方式依赖于超声(ultrasound,US)诱导气泡不断生成和破裂,即所谓的“空化效应”。空化效应释放的能量可以诱导声致发光或热解过程,以激活声敏剂产生以单线态氧($^1O_2$)为主的活性氧(reactive oxygen species,ROS)[7-8]。与光相比,超声具有更强穿透深度的优点,因此有望实现深部肿瘤更好的治疗效果[7,9-10]。研究表明,US 可以触发药物释放,实现化疗

药物在肿瘤部位精准释放,降低其不良反应[11-13]。其中,声敏剂的选择对于高效 SDT 非常关键。与传统的有机声敏剂相比,无机纳米声敏剂具有稳定性高、理化性质可控以及易于功能化等优点[14]。目前已有许多无机声敏剂,如二氧化钛、晶体硅、二维碳材料等相继被开发[15-18]。铱(iridium,Ir)作为一种过渡金属,由于其独特的物理和光学性能而在光电、催化、能源等诸多领域引起了广泛的关注[19-22]。已有研究[23-24]发现,氧化铱(IrO_X)在激光照射下能够产生活性氧,且其具有良好的生物相容性,因此其在纳米肿瘤诊疗领域中展示出了广泛的应用潜力。然而,目前针对铱基纳米材料在肿瘤治疗的研究尚处于起步阶段。与此同时,系统地探讨其作为声敏剂的可行性对于基于无机声敏剂的 SDT 研究具有重要意义。

基于以上的研究背景,本研究聚焦于 IrO_X 在 SDT 中的应用展开系统研究,通过直接热水解制备 IrO_X 纳米颗粒,并负载化疗药物阿霉素(doxorubicin,DOX),构建纳米载药复合物 IrO_X@DOX。由于肿瘤细胞内呈微酸性,IrO_X@DOX 可以实现 pH 及 US 双重刺激响应药物释放行为以提高化疗效果。与此同时,IrO_X 作为声敏剂在 US 辐照下可以产生 ROS,放大细胞内氧化应激加速肿瘤细胞死亡,最终达到 SDT-化疗协同治疗的效果。本研究为基于 IrO_X 纳米药物的开发提供新的思路,同时也将为 SDT 联合化疗策略的制订提供一种通用性的方案。

1 材料与方法

1.1 研究材料与实验动物

氯化铱($IrCl_3$,上海麦克林生化科技有限公司);阿霉素(DOX,上海阿拉丁试剂有限公司);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,碧云天生物公司);2,2,6,6-四甲基哌啶(TEMP,同仁化学有限公司);3-二苯基异苯并呋喃(DPBF,美国 Sigma 公司);活性氧检测试剂盒(碧云天生物公司);CCK-8 试剂盒(同仁化学有限公司);钙黄绿素-PI 试剂盒(同仁化学有限公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物公司);人脐静脉内皮细胞(HUVEC,中科院生命科学研究院细胞资源中心);小鼠乳腺癌 4T1 细胞(中科院生命科学研究院细胞资源中心)。4~6 周 BABL/c 雌性裸鼠 15 只,体质量约 18 g,购于卡文斯百格(苏州)模式动物研究有限公司。

1.2 仪器

透射电子显微镜(TEM,JEM-2100F,日本电子株式会社);傅立叶红外光谱仪(FT-IR,Perkin Elmer,美国);X 射线光电子能谱仪(XPS,Thermo 公司,美国);X 射线晶体粉末衍射仪(XRD,理学 Rigaku,日本);顺磁共振波谱仪(ESR,布鲁克,德国);粒度和 Zeta 电位分析仪(Malvern 公司,英国);紫外可见光分光光度计(UV-Vis,Perkin Elmer,美国);激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy,CLSM,Nikon 公司,日本);荧光显微镜(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);超声治疗仪(威尔德超声治疗仪,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 IrO_X@DOX 的制备及表征 将氯化铱($IrCl_3$,0.149 3 g)溶解在 50 mL 去离子水中,用氢氧化钠溶液(1 mol/L)调节 pH 值至 12,室温搅拌 2.5 h。随后,将溶液转移到油浴中(80 ℃)继续搅拌反应 1 h,得到产物 IrO_X 分散液。将上述溶液转移到超滤管(MWCO=14 kDa)中离心(2 660×g)15 min,用去离子水重悬,重复 3 次以去除过量的 $IrCl_3$ 及副产物。

将上述所得 IrO_X 分散液与 DOX 按不同比例(IrO_X:DOX=1:2、1:1、2:1、4:1、6:1)混合,室温下避光搅拌 24 h。将产物离心(20 000×g)15 min,收集上清液,重复 3 次以去除过量的 DOX,最后用去离子水重悬,得到 IrO_X@DOX 分散液。收集所有上清液和洗涤液,采用 UV-Vis 测定 DOX 的吸光度并根据公式计算不同条件的负载率。

负载率=(DOX 初始质量-上清液中 DOX 的质量)/ IrO_X@DOX 的质量×100%。

采用 TEM 观察 IrO_X 的形状;使用 XRD 对样品进行物相表征;通过 XPS 对 IrO_X 中的不同元素及价态进行表征;用 FT-IR 对纳米颗粒表面的官能团进行考察;采用 UV-Vis 测定不同样品的紫外吸收光谱;使用 Zeta 电位分析仪对材料合成过程中各个阶段的产物进行电位测定。

1.3.2 体外药物释放行为考察 采用透析法对 IrO_X@DOX 进行药物释放行为考察。具体地,精密称取一定质量的 DOX 溶解于 pH 值为 7.4 和 5.5 的 PBS 缓冲溶液(200 mL)中,分别测定其吸光度得到不同 pH 值条件下 DOX 的标准曲线。随后将 2 mL IrO_X@DOX 分散液装入透析袋(MWCO=3 kDa)并置于不同 pH 值的缓冲液(pH 值为 5.5 或 7.4)中室温避光搅拌。US 组在一定时间给予超声辐照(1 W/cm^2)30 s。在不同时间点从烧杯中取出 1 mL 释放液并补充同等体积的新鲜缓冲液。采用 UV-Vis 测定稀释液在

500 nm 处的吸光度。通过标准曲线计算不同条件下 DOX 的累积释放量,得到 DOX 的释放曲线。药物释放率=(释放的 DOX 质量/复合物中 DOX 的总质量)×100%

1.3.3 体外 SDT 效果评价 将 200 μL IrO_X@DOX 分散液(100 μg/mL)与 200 μL TEMP 溶液(100 mmol/L)混合,通过 US 辐照(1.0 MHz、1.0 W/cm^2)2 min,立即通过 ESR 光谱仪检测$^1O_2$的生成。同时,未进行超声处理作为对照。为了探究不同超声功率对$^1O_2$生成的影响,使用不同功率(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 W/cm^2)的 US 辐照相同浓度 IrO_X@DOX 分散液,通过 ESR 检测$^1O_2$的生成。此外,将 2.96 mL 的 IrO_X@DOX 溶液(100 μg/mL)和 40 μL 的 DBPF(2 mg/mL)避光混合,每隔 2 min 进行 US 辐射(1.0 MHz、1 W/cm^2、2 min),通过 UV-Vis 记录溶液在 200~650 nm 波长处的吸收曲线检测 ROS 的生成。

1.3.4 体外细胞摄取 采用 CLSM 观察 4T1 细胞对 IrO_X@DOX 的摄取能力。将 4T1 细胞(1×10^5/孔)接种到共聚焦培养皿中,待细胞贴壁后,空白对照组加入含 PBS 的培养基培养 6 h;实验组加入含 IrO_X@DOX 的培养基,并对其进行有无超声辐照(1 MHz、1.0 W/cm^2、1 min)处理,随后继续培养 6 h。用 PBS 清洗细胞 3 次,除去未被吞噬的纳米颗粒,用 4%的多聚甲醛固定细胞 15 min 后加入 DAPI 染色 5 min,最后用 CLSM 进行观察。

1.3.5 体外细胞 SDT 效果 将 4T1 细胞接种于 6 孔板中(1×10^5/孔)培养 24 h。将细胞进行以下分组:①PBS 组;②PBS+US 组;③IrO_X 组;④IrO_X+US 组;⑤IrO_X@DOX 组;⑥IrO_X@DOX+US 组。加入 2 mL 含有上述纳米颗粒的新鲜培养基继续孵育 12 h。PBS 洗涤 3 次,随后加入 ROS 探针(DCFH-DA)孵育 30 min 后,继续用 PBS 洗涤 3 次,同时对②、④和⑥组进行超声辐照(1.0 MHz、1.0 W/cm^2、1 min)后继续孵育 2 h。最后将细胞用荧光显微镜进行观察。进一步采用流式细胞仪检测 ROS 生成情况,细胞处理如上所述。

1.3.6 体外化疗-SDT 协同治疗效果 首先对 IrO_X 的细胞相容性进行考察。具体地,将 HUVEC 细胞接种于 96 孔板(1×10^4/孔)中,在 37 ℃、5% CO_2培养箱中培养 24 h。随后加入 100 μL 含有不同浓度 IrO_X 的新鲜培养基继续孵育 12 h。移除培养基,用 PBS 洗涤 3 次,随后加入 100 μL 含 10 μL CCK-8 试剂的培养基继续孵育 1 h。最后,用酶标仪读取 450 nm 处的吸光值,根据说明书计算细胞存活率。每组样品设置 5 个复孔,每个样品平行测定 3 次。

采用 CCK-8 法评估 IrO_X@DOX 引发的化疗-SDT 协同治疗效果。将 4T1 细胞接种于 96 孔板(1×10^4/孔)中培养 24 h。实验按 1.3.5 分组。对于 US 辐射组,细胞加入纳米颗粒孵育 6 h 后进行 US 辐照(1.0 MHz、1 min),并继续孵育 12 h。随后移除培养基,用 PBS 洗涤 3 次后,采用 CCK-8 法计算细胞存活率。此外,细胞经过不同治疗处理后,加入 Calcein AM/PI(Calcein AM 2 μmol/L,PI 4.5 μmol/L,100 μL)进行染色 15 min。随后弃去培养液并用 PBS 清洗,最后在荧光显微镜下观察细胞生存状态。

流式细胞仪检测细胞凋亡:4T1 细胞(1×10^5/孔)接种在 6 孔板中孵育 24 h。根据上述 CCK-8 的实验步骤对细胞进行处理。孵育后,细胞用胰酶消化,PBS 洗涤,离心收集细胞后用流式凋亡染色试剂盒(Annexin V-FITC/PI 染液)分析早期凋亡、晚期凋亡和坏死细胞数量。

1.4 肿瘤模型的建立和治疗

将 100 μL 含 2×10^6 个 Hepa 1-6 细胞悬液皮下注射至 BALB/c 雌性裸鼠,建立皮下移植瘤模型。当肿瘤体积达到 120 mm^3 时,随机分为 5 组($n=3$):①生理盐水组;②IrO_X 组;③IrO_X@DOX 组;④IrO_X+US 组;⑤IrO_X@DOX+US 组。裸鼠相应注射生理盐水,IrO_X 及 IrO_X@DOX(8 mg/mL,100 μL)。超声辐照组在注药 12 h 后进行超声照射(1.5 W/cm^2、1.5 MHz、50%占空比、5 min),治疗过程每 3 天重复 1 次,每隔 3 天对小鼠体质量及肿瘤体积进行记录,连续 14 d。肿瘤体积计算公式为:$V=L\times W^2/2$,其中 V、L 和 W 分别代表肿瘤的体积、长度和宽度。治疗 14 天后进行静脉注射造影剂,观察肿瘤生长情况,并对裸鼠施行安乐死,取相应的瘤体拍照并进行 HE 染色观察。计算肿瘤体积抑制率 $=(V_{对照组}-V_{实验组})/V_{对照组}\times100\%$。

1.5 统计学分析

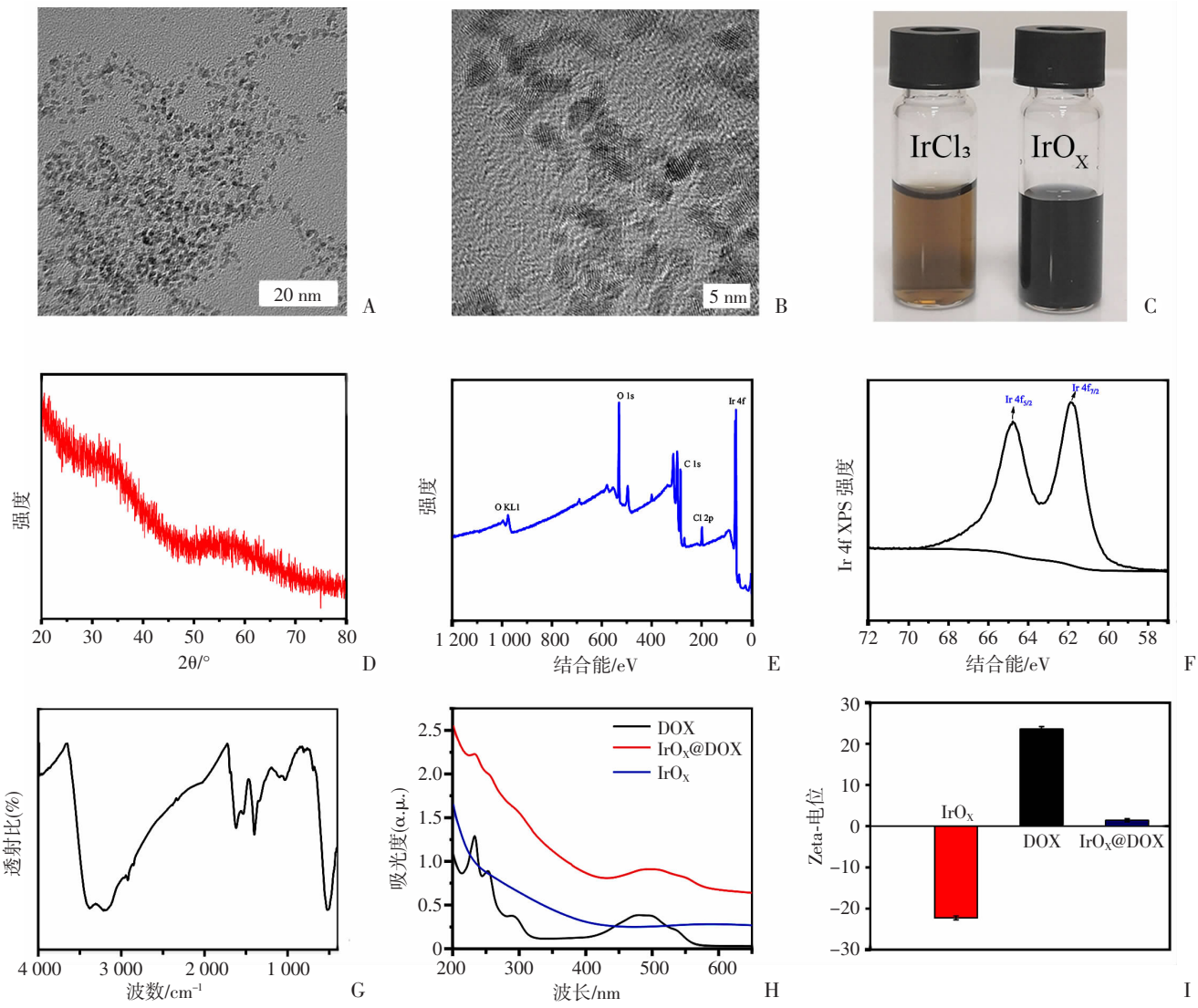
采用 Origin 和 SPSS 26.0 统计软件进行制图和统计学分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两两比较采用独立样本 t 检验,多样本均数比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IrO_X@DOX 的制备、表征及理化性质评价

采用热水解法制备了 IrO_X 纳米颗粒。TEM 显示制备的 IrO_X 呈不规则纳米簇结构,且粒径大约在 5 nm(图 1A)。同时可以清晰地观察到 IrO_X 的晶格条纹(图 1B)。对比反应前后的溶液颜色,可以看到合成的

IrO_X 为蓝紫色分散液,不同于氯化铱溶液(图 1C),证明高温引发了 Ir^{3+} 的氧化反应。XRD 谱图中,IrO_X 显示了明显的宽峰,表明其趋向于小颗粒聚集生长(图 1D)。通过 XPS 对 IrO_X 中的元素价态进行确证,从 XPS 全谱(图 1E)可以看到与 Ir4f、O1s 和 C1s 相关的特征峰,初步说明 IrO_X 的成功制备。Ir4f 的 XPS 谱在 64.7 eV 和 61.8 eV 处显示了两个特征峰(图 1F),可以归属于 $Ir4f_{5/2}$ 和 $Ir4f_{7/2}$。FT-IR 光谱显示:IrO_X 在 3 300 cm^{-1} 附近出现强而宽吸收,归属于 IrO_X 表面存在的一些氢氧化物(图 1G),可能是由于 Ir^{3+} 的氧化所致。从 UV-Vis 光谱可以看出,IrO_X 在 200~650 nm 都具有较好的吸收。在 IrO_X@DOX 的 UV-Vis 光谱中出现了 DOX 的特征吸收峰(485 nm),证明 DOX 的成功负载(图 1H)。此外,Zeta 电位测定显示 IrO_X 的电势为(-22.30±0.47)mV,而 DOX 的电势为(23.60±0.62)mV。DOX 负载后,IrO_X@DOX 的电势变为(1.40±0.39)mV(图 1I),说明 IrO_X 与 DOX 之间可以依靠静电引力相结合。



A、B:IrO_X 的电镜图像,呈颗粒状聚集态;C:反应前后的溶液;D:IrO_X 纳米颗粒的 XRD 图谱;E:XPS 图谱;F:Ir 4f 的 XPS 图谱;G:IrO_X 的 FT-IR 光谱图;H:IrO_X、DOX 和 IrO_X@DOX 的紫外吸收光谱图;I:IrO_X、DOX 和 IrO_X@DOX 的 Zeta 电位

图 1 IrO_X 与 IrO_X@DOX 的形貌表征及理化性能测试

2.2 药物负载及体外药物释放

通过 UV-Vis 对其载药量进行考察,建立 DOX 的标准曲线,如图 2A 所示。IrO_X 对 DOX 的负载量在一定药物浓度内随着 DOX 的浓度的增加而增加(图 2B)。当 IrO_X 与 DOX 的比例为 4∶1时,载药率达到了(18.7±0.2)%。

IrO_X@DOX 体外药物释放:如图 2C 所示,当 pH=7.4 时,DOX 释放率为(9.7±1.2)%,而在 pH=5.5 时,DOX 释放率为(40.0±1.7)%。这是由于酸性 pH 值使得 DOX 发生质子化而释放。此外,US 刺激会进一步加速 DOX 释放。在 pH=5.5 及 US 刺激条件下,DOX 的释放率增加到(61.1±1.3)%。可能是由于 US 刺激下的空化效应使得 DOX 与 IrO_X 之间的作用力减弱而释放药物。综上,IrO_X@DOX 具有 pH 及 US 双重响应药物释放行为,有望提高 DOX 的化疗效果。

2.3 IrO_X 体外活性氧产生性能考察

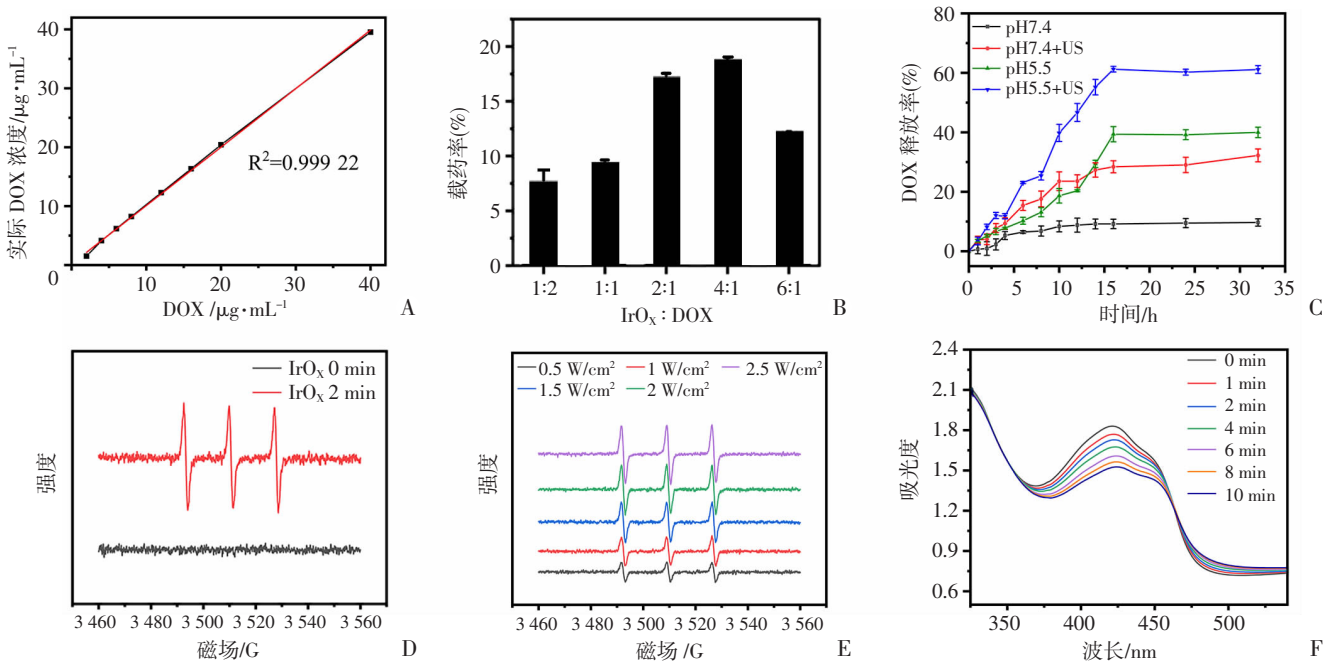
IrO_X 的体外 ROS 产生性能:与未进行 US 辐照组相比,US 辐照组可以明显检测到 $^1O_2$ 的生成(图 2D)。同时,随着 US 辐照功率的增大,TEMP/$^1O_2$ 光谱峰值逐渐增大,表明 IrO_X 引发的 $^1O_2$ 产生具有功率依赖性(图 2E)。此外,采用 DPBF 作为活性氧探针,通过 UV-Vis 记录不同时间点吸收峰强度。由图 2F 可知,在 398 nm 波长处,DPBF 的吸收峰随时间延长而下降,表明在 US 辐照下,随着时间的延长,IrO_X 可以不断产生 $^1O_2$。

2.4 体外细胞摄取

采用 CLSM 观察 4T1 细胞对 IrO_X@DOX 的摄取行为。如图 3 所示,细胞核被 DAPI 染色而呈现蓝色荧光,而 DOX 在激发光照射下呈现红色荧光。空白对照组无红色荧光,而经 IrO_X@DOX 处理后的细胞,可观察到明显的红色荧光,表明 4TI 细胞能够摄取 IrO_X@DOX。相比之下,IrO_X@DOX+US 组显示出更强的红色荧光信号,表明超声不仅可以增强细胞对纳米颗粒的摄取,而且可以促进 DOX 在胞内释放,这为后续 SDT-化疗协同治疗提供了基础。

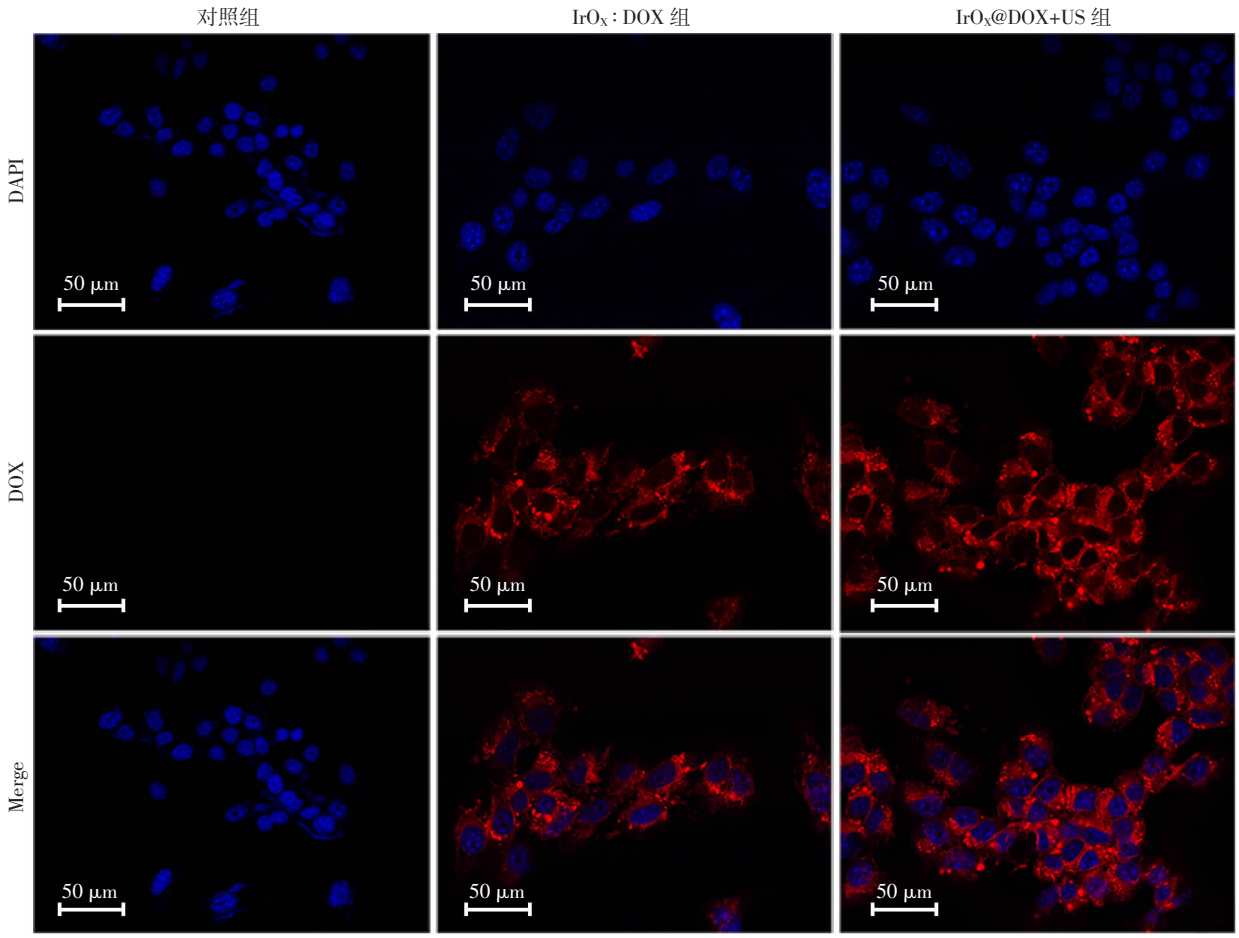
2.5 细胞水平上的 SDT 性能评价

DCFH-DA 无荧光,可以穿过细胞膜,进入细胞后被细胞内的酯酶水解生成 DCFH,而 DCFH 不能通透细胞膜,从而使探针装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF,从而检测细胞内活性氧的水平。荧光显微镜下观察到:对照组几乎未见绿色荧光,而 IrO_X+US 组的绿色荧光明显强于单独 IrO_X 组或 PBS+US 组(图 4A)。进一步证明 IrO_X 的 SDT 效果。此外,IrO_X@DOX+US 组活性氧产量明显高于其余组。同时,流式细胞术定量检测也证实了以上结论,IrO_X@DOX+US 组活性氧产量最高(图 4B)。



A:DOX 溶液的标准曲线;B:不同比例(IrO_X:DOX)下 DOX 的载药率;C:IrO_X@DOX 在不同 pH 值及有无 US 辐照下的 DOX 释放行为;D:IrO_X 在 US 辐照前后的 ESR 光谱;E:IrO_X 在不同 US 功率辐照下的 ESR 光谱;F:IrO_X 与 DPBF 混合后,经超声辐照后,在不同时间点 DPBF 的 UV-Vis 光谱

图 2 药量、体外药物释放曲线和单线态氧产生性能考察



DAPI 标记细胞核(蓝色荧光);DOX 为红色荧光;Merge 为融合图像

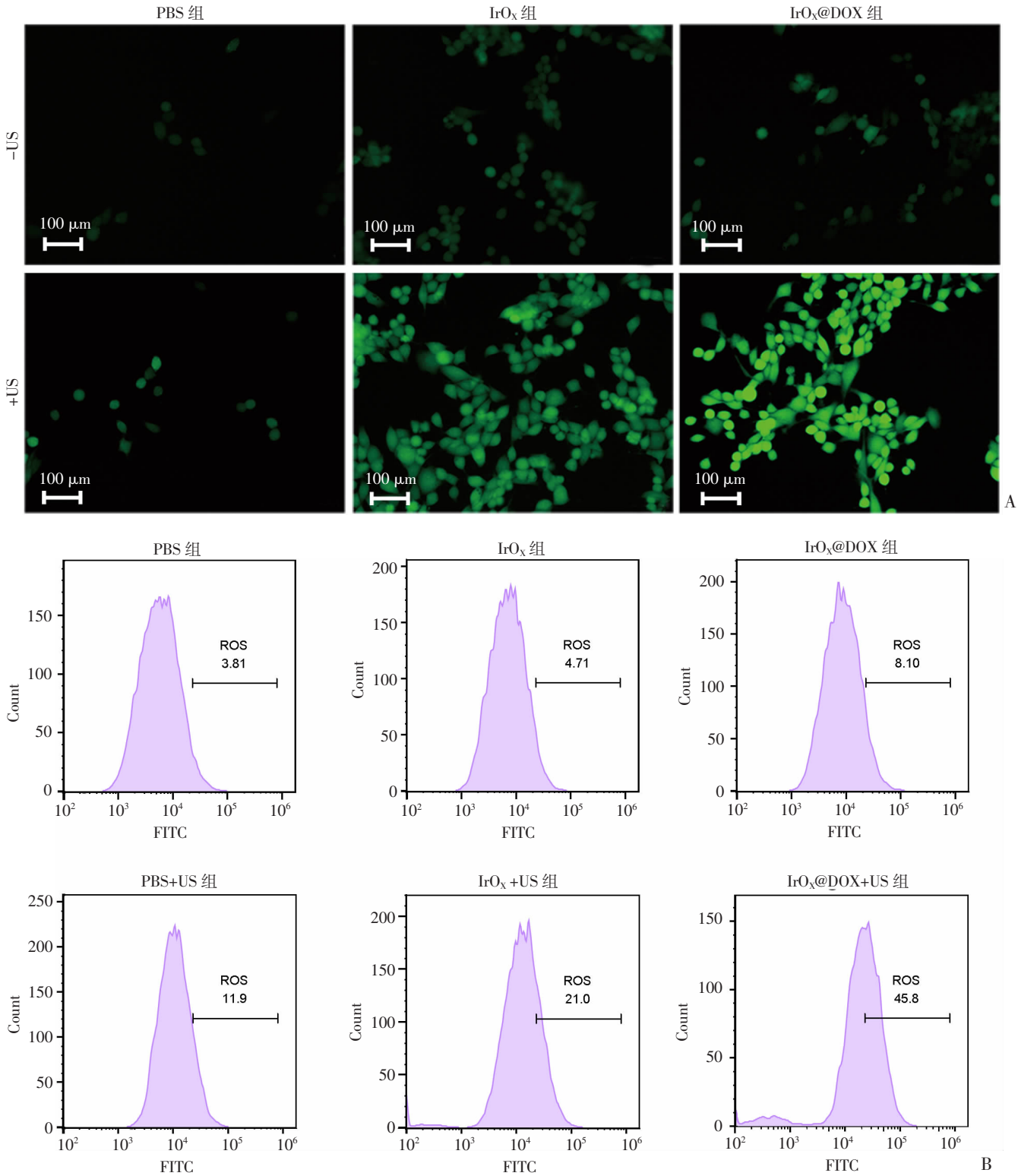
图 3 4T1 细胞经 IrO_X@DOX 孵育后在有无 US 辐照下的 CLSM 图像

2.6 体外 SDT-化疗协同治疗效果评价

IrO_X 的细胞相容性:如图 5A 所示,当 IrO_X 浓度在 0~100 μg/mL,4T1 细胞与之共孵育 12 h 后的存活率均高于 85%,可见实验浓度范围 IrO_X 的细胞相容性良好。IrO_X 联合低频超声后,细胞的生长明显受到抑制,证明了 IrO_X 的 SDT 效果(图 5B)。IrO_X@DOX 与 US 的协同治疗效果:如图 5C 所示,在相同的 DOX 浓度下,IrO_X@DOX+US 组的细胞存活率(19.4%)明显低于无 US 辐射组(37.4%),且细胞毒性呈现明显的 DOX 浓度依赖性,可见 IrO_X@DOX 与 US 辐照相结合可以产生明显的协同治疗效果。Calcein AM 和 PI 双染色结果显示(图 5D):与 IrO_X+US、IrO_X@DOX 组相比,IrO_X@DOX+US 组显示出了大量的红色荧光信号(肿瘤细胞死亡)。流式细胞术实验结果表明(图 5E):对照组、PBS+US、IrO_X、IrO_X+US、IrO_X@DOX 和 IrO_X@DOX+US 组细胞凋亡率分别为 6.8%、14.6%、6.9%、38.8%、37.8%、54.7%。

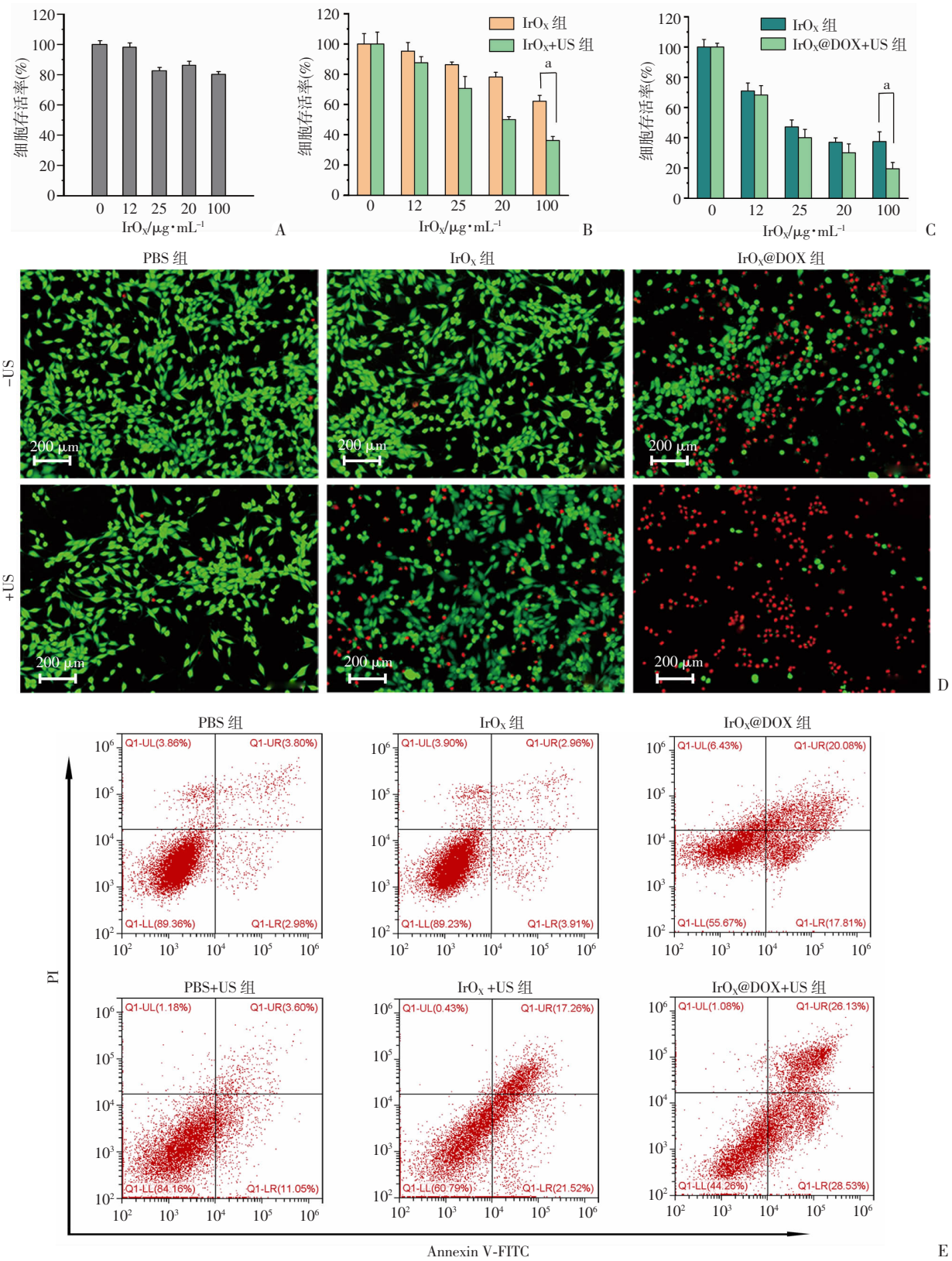
2.7 体内抗肿瘤疗效

建立皮下移植瘤来验证治疗效果,治疗过程中各组小鼠体质量变化(图 6A)差异无统计学意义,表明各组所注射的纳米粒子对小鼠体质量无明显影响。IrO_X+US 组、IrO_X@DOX 组、IrO_X@DOX+US 组与对照组相比,肿瘤体积有所缩小(图 6B),差异具有统计学意义(P<0.05)。抑制率分别为 27%、57%及 76%,这与数码图片(图 6C)相符,表明 IrO_X@DOX 与 US 辐照相结合可以产生明显的协同治疗效果。此外,超声造影结果(图 6D)显示,与对照组相比,IrO_X@DOX+US 组肿瘤体积小,肿瘤内部组织存在坏死,治疗效果最好,这与 HE 实验结果一致(图 6E)。以上实验结果表明表明当化疗药物 DOX 与 SDT 联合作用时,可以得到良好的治疗效果。



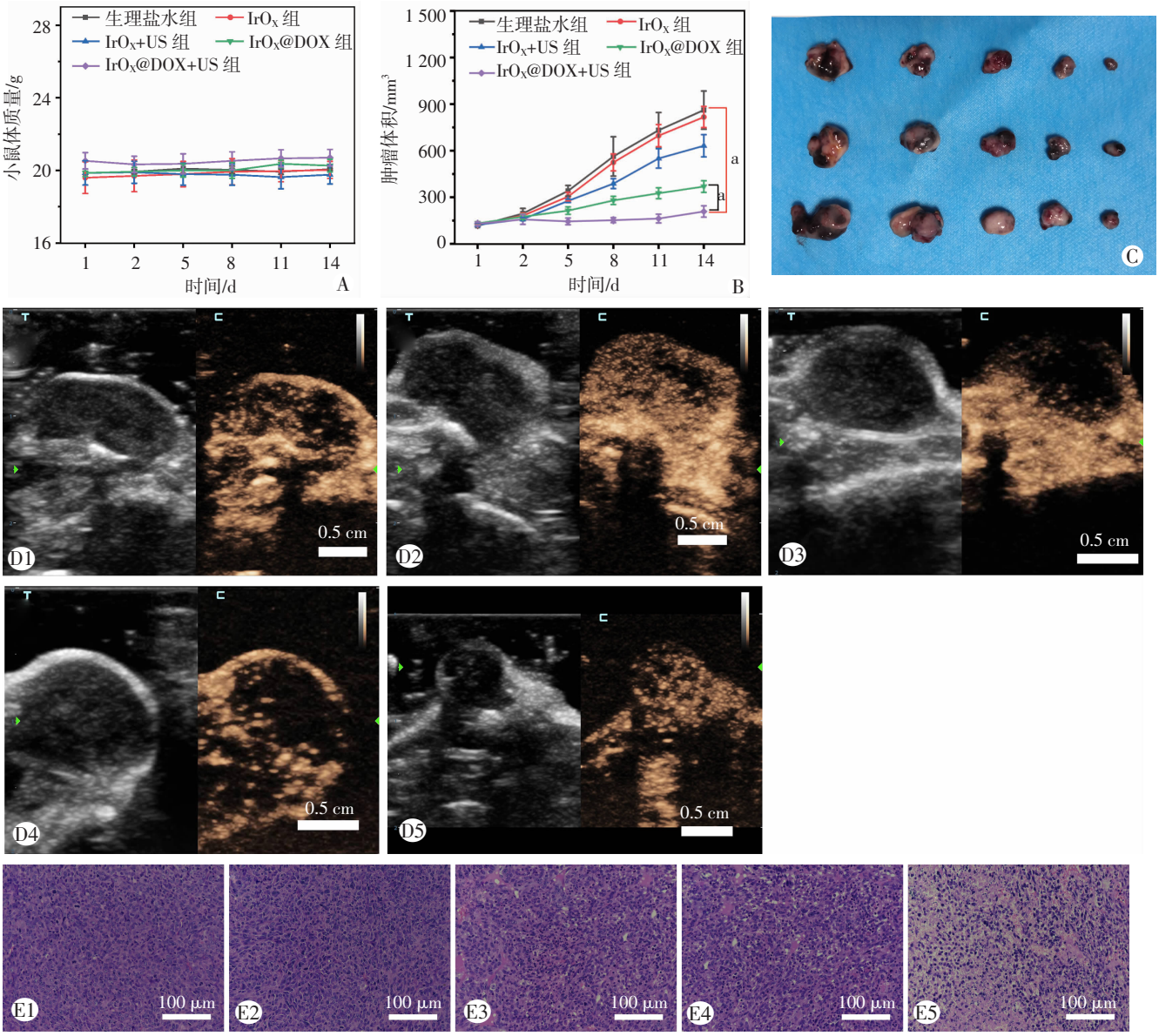
A:4T1 细胞与 DCFH-DA 探针孵育后经不同方式处理后的荧光图片;B:相对应的流式定量结果

图 4 细胞水平上 IrO_x@DOX 的活性氧产生性能评价



A:不同浓度 IrO_X 处理 4T1 细胞 24 h 后的细胞存活率($n=5$);B:US 辐照对 4T1 细胞不同浓度 IrO_X 孵育后存活率的影响($n=4$) a:$P<0.05$;C:US 辐照对 4T1 细胞不同 DOX 浓度的 IrO_X@DOX 处理后细胞存活率的影响($n=4$) a:$P<0.05$;D:4T1 细胞经不同方式处理后 Calcein AM 和 PI 双染色后的荧光图片;E:流式细胞术分析 4T1 细胞经不同治疗方式处理后采用 AnnexinV-FITC/PI 染色的凋亡情况

图 5 细胞毒性与 SDT-化疗协同治疗效果评价



A:治疗期间小鼠体质量变化(n=3);B:治疗期间小鼠肿瘤体积生长变化(n=3) a:P<0.05;C:治疗结束后瘤块离体照片;D:经不同治疗方式处理后小鼠瘤体的超声造影图;E:治疗结束后瘤块离体 HE 染色观察凋亡情况; D1、E1:生理盐水组;D2、E2:IrO_X 组;D3、E3:IrO_X+US 组;D4、E4:IrO_X@ DOX 组;D5、E5:IrO_X@ DOX+US 组

图 6 SDT-化疗协同治疗体内治疗效果评价

3 讨论

化疗作为目前临床上治疗肿瘤最常见的一种治疗方式,但由于其不良反应给病人带来了极大的痛苦,因此,科研工作者们也为减轻化疗带来的不良反应做了很多研究。与单一疗法获得的有限疗效及明显的不良反应相比,协同治疗有望实现在较低剂量的药物下产生更高的治疗效果,从而减轻高剂量给药带来的不良反应。

SDT 作为一种新兴的肿瘤治疗策略,近年来受到了科研工作者的广泛关注[25-26]。由于超声具有高聚焦、强穿透力的特点,可以解决激光面临的穿透力不足的缺点[8]。然而,SDT 的治疗效率受限于肿瘤微环境,尤其是乏氧问题。因此,单一的 SDT 往往无法达到预期的治疗效果,急需开发一种基于 SDT 的协同治疗模式用于肿瘤的高效治疗[7,9]。传统的有机声敏剂的水溶性有限、化学稳定性低、光毒性大,限制了它们在癌症治疗中的应用[18]。无机声敏剂成为近年来的研究热点,已有相关文献报道二氧化钛可作为声敏剂进行声动力治疗,其产生 ROS 机制可能是超声辐照能够使

钛元素发生电子跃迁,产生电子空穴(H^+-e^-),进一步将周围的水和氧气转换为 ROS[27]。在探究 IrO_X的声动力效果时,发现 IrO_X产生活性氧,我们推测 IrO_X 作为无机声敏剂产生 ROS 的机制与二氧化钛相似,可能是由于超声空化效应产生的局部能量可以使 IrO_X发生电子跃迁,产生电子空穴,与水和氧气发生作用从而产生单线态氧[23,28-29]。

本研究以 IrO_X作为一种无机声敏剂,并复合 DOX 形成一种纳米载药复合物 IrO_X@DOX 用于肿瘤 SDT-化疗协同治疗。超声不仅可以增强细胞对纳米颗粒的摄取,而且可以促进 DOX 在胞内释放。这可能是由于超声刺激产生的空化效应可以提高细胞膜的通透性,从而促进了肿瘤细胞对纳米颗粒的摄取[30]。IrO_X@DOX 具有 pH 和超声双重响应药物释放行为,同时可以实现声动力疗法协同化疗高效杀死肿瘤细胞。一方面,超声刺激 IrO_X 生成 ROS,实现声动力治疗;另一方面,超声促进了纳米药物的吞噬,一定程度上降低了化疗药物的用量,起到协同治疗的效果。本研究在细胞层面上采用 CCK-8、Calcein AM 和 PI 双染色及流式凋亡检测结果表明 IrO_X@DOX 可在 US 辐照下产生活性氧,结合 DOX 化疗,验证了其良好的协同治疗效果。需要指出的是,本研究还存在一定的不足,如未进行深入的机制探究,未进行详细的体内研究,同时 IrO_X@DOX 的肿瘤富集与体内生物安全性需进一步验证。

综上所述,本研究成功制备的 IrO_X@DOX 的纳米载药体系,实现了 pH 及超声控制释药,可实现声动力与化疗联合的协同治疗。本研究拓展 IrO_X 作为声敏剂在 SDT 中应用,同时也为构建新型肿瘤协同治疗纳米系统提供了一种新思路与新方法。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[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] KONG F H, YE Q F, MIAO X Y, *et al*. Current status of sorafenib nanoparticle delivery systems in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Theranostics, 2021, 11(11): 5464-5490. DOI: 10.7150/thno.54822.

[4] HU H, FENG W, QIAN X Q, *et al*. Emerging nanomedicine-enabled/enhanced nanodynamic therapies beyond traditional photodynamics[J]. Adv Mater, 2021, 33(12): e2005062. DOI: 10.1002/adma.202005062.

[5] REN Z G, SUN S C, SUN R R, *et al*. A metal-polyphenol-coordinated nanomedicine for synergistic cascade cancer chemotherapy and chemodynamic therapy[J]. Adv Mater, 2020, 32(6): e1906024. DOI: 10.1002/adma.201906024.

[6] ZHAO N X, ZENG Z H, ZU Y L. Self-assembled aptamer-nanomedicine for targeted chemotherapy and gene therapy[J]. Small, 2018, 14(4): 1702103. DOI: 10.1002/smll.201702103.

[7] QIAN X Q, ZHENG Y Y, CHEN Y. Micro/nanoparticle-augmented sonodynamic therapy (SDT): breaking the depth shallow of photoactivation[J]. Adv Mater, 2016, 28(37): 8097-8129. DOI: 10.1002/adma.201602012.

[8] PAN X T, WANG H Y, WANG S H, *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.

[9] MA A Q, CHEN H Q, CUI Y H, *et al*. Metalloporphyrin complex-based nanosonosensitizers for deep-tissue tumor therapeutics by noninvasive sonodynamic therapy[J]. Small, 2019, 15(5): e1804028. DOI: 10.1002/smll.201804028.

[10] SON S, KIM J H, WANG X W, *et al*. Multifunctional sonosensitizers in sonodynamic cancer therapy[J]. Chem Soc Rev, 2020, 49(11): 3244-3261. DOI: 10.1039/c9cs00648f.

[11] LEI B, CHEN M, WANG Y, *et al*. Double security drug delivery system DDS constructed by multi-responsive (pH/redox/US) microgel[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020, 193: 111022. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111022.

[12] KARIMI M, GHASEMI A, SAHANDI ZANGABAD P, *et al*. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems[J]. Chem Soc Rev, 2016, 45(5): 1457-1501. DOI: 10.1039/c5cs00798d.

[13] MENG Z Q, ZHOU X F, SHE J L, *et al*. Ultrasound-responsive conversion of microbubbles to nanoparticles to enable background-free in vivo photoacoustic imaging[J]. Nano Lett, 2019, 19(11): 8109-8117. DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b03331.

[14] QIAN X Q, HAN X 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.

[15] YANG S W, WANG X L, HE P, *et al*. Graphene quantum dots with pyrrole N and pyridine N: superior reactive oxygen species generation efficiency for metal-free sonodynamic tumor therapy[J]. Small, 2021, 17(10): e2004867. DOI: 10.1002/smll.202004867.

[16] OSMINKINA L A, NIKOLAEV A L, SVIRIDOV A P,

et al. Porous silicon nanoparticles as efficient sensitizers for sonodynamic therapy of cancer[J]. Micropor Mesopor Mater, 2015, 210: 169-175. DOI: 10.1016/j.micromeso.2015.02.037.

[17] ZHAO Y, ZHU Y C. Synergistic cytotoxicity of low-energy ultrasound and innovative mesoporous silica-based sensitive nanoagents[J]. J Mater Sci, 2014, 49(10): 3665-3673. DOI: 10.1007/s10853-014-8073-y.

[18] BAI S, YANG N, WANG X, *et al*. Ultrasmall iron-doped titanium oxide nanodots for enhanced sonodynamic and chemodynamic cancer therapy[J]. ACS Nano, 2020, 14(11): 15119-15130. DOI: 10.1021/acsnano.0c05235.

[19] WU J R, WILLIAMS G R, NIU S W, *et al*. Biomineralized bimetallic oxide nanotheranostics for multimodal imaging-guided combination therapy[J]. Theranostics, 2020, 10(2): 841-855. DOI: 10.7150/thno.40715.

[20] ZHEN W Y, LIU Y, LIN L, *et al*. BSA-IrO_2: catalase-like nanoparticles with high photothermal conversion efficiency and a high X-ray absorption coefficient for anti-inflammation and antitumor theranostics[J]. Angew Chem Int Ed, 2018, 57(32): 10309-10313. DOI: 10.1002/anie.201804466.

[21] WU J R, NIU S W, BREMNER D H, *et al*. A tumor microenvironment-responsive biodegradable mesoporous nanosystem for anti-inflammation and cancer theranostics[J]. Adv Healthc Mater, 2020, 9(2): e1901307. DOI: 10.1002/adhm.201901307.

[22] LI Q L, LIU D L, XU L, *et al*. Wire-in-tube IrO_x architectures: alternative label-free immunosensor for amperometric immunoassay toward α-fetoprotein[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(40): 22719-22726. DOI: 10.1021/acsami.5b07895.

[23] ZHEN W Y, LIU Y, ZHANG M C, *et al*. Multi-caged IrO x for facile preparation of "six-in-one" nanoagent for subcutaneous and lymphatic tumors inhibition against recurrence and metastasis[J]. Adv Funct Mater, 2020, 30(24): 2002274. DOI: 10.1002/adfm.202002274.

[24] ZHEN W Y, LIU Y, WANG W, *et al*. Specific "unlocking" of a nanozyme-based butterfly effect to break the evolutionary fitness of chaotic tumors[J]. Angew Chem Int Ed, 2020, 59(24): 9491-9497. DOI: 10.1002/anie.201916142.

[25] 郭丹, 汪星月, 谭米肖, 等. 声敏型脂质纳米粒联合低功率聚焦超声对 HepG2 细胞增殖的影响及其体外 CT 成像的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(23): 2180-2189. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201806153.
GUO D, WANG X Y, TAN M X, *et al*. Effect of sound sensitive nano-liposomes combined with low intensity focused ultrasound on proliferation of HepG2 cells and its CT imaging *in vitro*[J]. J Third Mil Med Univ, 2018, 40(23): 2180-2189. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201806153.

[26] 李倩茹, 郝兰, 王艺睿, 等. 基于 DVDMS/IR780 复合纳米粒抗肿瘤声动力实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(7): 606-613. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202011241.
LI Q R, HAO L, WANG Y R, *et al*. Preparation of sinoporphyrin sodium and IR780-based composite nanoparticles and its anti-tumor efficacy in sonodynamic therapy[J]. J Third Mil Med Univ, 2021, 43(7): 606-613. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202011241.

[27] WANG X W, ZHONG X Y, BAI L X, *et al*. Ultrafine titanium monoxide (TiO_{1+x}) nanorods for enhanced sonodynamic therapy[J]. J Am Chem Soc, 2020, 142(14): 6527-6537. DOI: 10.1021/jacs.9b10228.

[28] CHEN H J, ZHOU X B, GAO Y, *et al*. Recent progress in development of new sonosensitizers for sonodynamic cancer therapy[J]. Drug Discov Today, 2014, 19(4): 502-509. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.01.010.

[29] COSTLEY D, MC EWAN C, FOWLEY C, *et al*. Treating cancer with sonodynamic therapy: a review[J]. Int J Hyperther, 2015, 31(2): 107-117. DOI: 10.3109/02656736.2014.992484.

[30] GEERS B, LENTACKER I, SANDERS N N, *et al*. Self-assembled liposome-loaded microbubbles: The missing link for safe and efficient ultrasound triggered drug-delivery[J]. J Control Release, 2011, 152(2): 249-256. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.02.024.

(**收稿**:2021-05-24;**修回**:2021-07-27)

(编辑 栾 嘉)