

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.07.008

四氧化三铁纳米粒子增强二氢卟吩 e6 对胶质瘤 U251 细胞的声动力治疗效果

张鹏^{1a, 1b}, 陈姿含², 任中玉^{1a, 1b}, 陈剑娇^{1a}, 陈汉仁^{1a}, 文剑^{1a, 1b} (1. 桂林医学院 a. 临床医学院, b. 附属医院 神经内科, 广西 桂林 541040; 2. 桂林医学院第二附属医院 病理科, 广西 桂林 541199)

[摘要] **目的:** 探讨四氧化三铁(Fe_3O_4)纳米粒子(PION)作为药物载体增强二氢卟吩 e6(chlorin e6, Ce6)在胶质瘤中的增效作用。**方法:** 采用高温降解法和相转移法制备 PEG- Fe_3O_4 @Ce6 复合纳米粒子(PION@E6), 用水合粒径分析、透射电镜、胶体稳定性分析、紫外可见光吸收光谱等方法对 PION@E6 进行鉴定。CCK-8 法检测胶质瘤 U251 细胞的增殖活性, 流式细胞术检测细胞的凋亡水平, DCFH-DA 探针法检测细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平。构建 BALB/c-nu 裸鼠胶质瘤 U251 细胞移植瘤模型, 动物活体荧光成像术及磁共振成像(MRI)观察 PION@E6 及 Ce6 在移植瘤中的滞留时间, 比较 PION@E6 声动力治疗组及 Ce6 声动力治疗组的第 28 天生存情况及肿瘤体积。**结果:** PION@E6 的核心粒径为 10 nm、水合粒径为(37.86±12.90)nm, 具有良好的水溶性和稳定性; 吸收光谱及 XRD 图谱显示 Ce6 已经负载到 Fe_3O_4 纳米粒子上。与 Ce6 声动力组比较, PION@E6 声动力组 U251 细胞的增殖活性显著下降($P<0.05$), 细胞凋亡率显著升高(均 $P<0.05$), 细胞中 ROS 水平显著升高($P<0.05$)。荷瘤裸鼠胶质瘤 U251 细胞移植瘤治疗实验结果显示, 与 Ce6 声动力治疗组比较, PION@E6 声动力治疗组裸鼠移植瘤组织中滞留时间显著延长($P<0.05$), 存活的裸鼠数显著增多, 移植瘤体积显著缩小($P<0.01$)。**结论:** Fe_3O_4 纳米粒子对 Ce6 介导的胶质瘤 U251 细胞声动力治疗具有明显的增效作用。

[关键词] 胶质瘤; U251 细胞; 四氧化三铁纳米粒子; 二氢卟吩 e6; 声动力疗法; 活性氧

[中图分类号] R739.41; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)07-0702-07

Fe_3O_4 nanoparticles enhance the sonodynamic therapy effect of chlorin e6 on glioma U251 cells

ZHANG Peng^{1a, 1b}, CHEN Zihan², REN Zhongyu^{1a, 1b}, CHEN Jianjiao^{1a}, CHEN Hanren^{1a}, WEN Jian^{1a, 1b} (1a. School of Clinical Medicine; 1b. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541040, Guangxi, China; 2. Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541199, Guangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the synergistic effect of Fe_3O_4 nanoparticles (PION), as a drug carrier, on enhancing the effect of chlorin e6 (Ce6) in glioma. **Methods:** PEG- Fe_3O_4 @Ce6 composite nanoparticles (PION@E6) were prepared by high temperature degradation method and phase transfer method, and then verified by hydrated particle size analysis, transmission electron microscopy, colloidal stability analysis and ultraviolet-visible light absorption spectroscopy, etc. CCK-8 method was used to detect the proliferation activity of glioma U251 cells, Flow cytometry was used to detect the apoptosis of the cells, and the DCFH-DA probe method was used to detect the level of reactive oxygen species (ROS) in the cells. Glioma U251 cell transplanted tumor model was constructed on BALB/c-nu nude mice. The retention time of PION@E6 and Ce6 in transplanted tumors was observed with animal fluorescence imaging technology and magnetic resonance imaging (MRI), and the survival and tumor volume on the 28th day in the PION@E6 sonodynamic therapy group and Ce6 sonodynamic therapy group were compared. **Results:** Transmission electron microscopy and hydrated particle size analysis showed that the core particle size of PION@E6 was 10 nm and the hydrated particle size was (37.86±12.90) nm; colloidal stability analysis showed that PION@E6 had good water solubility and stability; and the absorption

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.32060228); 广西自然科学基金资助项目(No. 2017GXNSFAA198112, No. 2019GXNSFAA245077); 广西研究生教育创新计划资助项目(No. YCSW2019214, No. YCSW2020225); 广西脑与认知神经科学重点实验室开放课题资助项目(No. GKLBNCN-20200108-02)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.32060228), the Natural Science Foundation of Guangxi (No.2017GXNSFAA198112, No.2019GXNSFAA245077), the Innovation Program of Postgraduate Education in Guangxi (No. YCSW2019214, No. YCSW2020225), and the Key Laboratory of Brain and Cognitive Neuroscience Open Project of Guangxi (No. GKLBNCN-20200108-02)

[作者简介] 张鹏(1993—), 男, 硕士生, 主要从事神经系统肿瘤的研究, E-mail: 840813057@qq.com

[通信作者] 文剑(WEN Jian, corresponding author), 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事生物医学工程和神经系统肿瘤的研究, E-mail: wenjian2400@163.com

spectrum and XRD atlas showed that Ce6 had been loaded on Fe_3O_4 nanoparticles. Compared with the Ce6 sonodynamic group, the proliferation activity of U251 cells in the PION@E6 sonodynamic group was significantly decreased ($P<0.05$), the apoptosis rate was significantly increased (all $P<0.05$), and the level of ROS in the cells was significantly increased ($P<0.05$). *In vivo* experiments on nude mice bearing glioma U251 cell transplanted tumors showed that compared with Ce6 sonodynamic therapy group, the retention time of Ce6 in the transplanted tumor tissues of the PION@E6 sonodynamic therapy group was significantly prolonged ($P<0.05$), the number of survived nude mice was significant increased, and the transplanted tumor volume was significantly reduced ($P<0.01$). **Conclusion:** Fe_3O_4 nanoparticles have a significant synergistic effect on Ce6-mediated sonodynamic therapy of glioma U251 cells.

[Key words] glioma; U251 cell; Fe_3O_4 nanoparticles; chlorin e6; sonodynamic therapy; reactive oxygen species (ROS)

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(7): 702-708. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.07.008]

声动力疗法 (sonodynamic therapy, SDT) 是一种活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 介导的肿瘤治疗方法, 它以声敏剂在超声激活下产生 ROS, 从而引起细胞凋亡和坏死^[1-2]。低频率超声具有组织衰减系数低的特点, 与光动力相比对生物组织有较强的穿透力^[3], 与放疗相比对正常脑组织无杀伤作用^[4], 因而通过超声激活声敏剂产生的 SDT 是一种具有潜力的抗肿瘤疗法^[5]。近年来已经进行了许多关于声敏剂方面的实验研究。第二代光敏剂二氢卟吩 e6 (chlorin e6, Ce6) 即是光敏剂, 又是声敏剂, Ce6 的 SDT 已被广泛应用于肺癌^[6]、乳腺癌^[7]、肝癌^[8] 等肿瘤的治疗中, 因其水溶性差降低了 SDT 的疗效^[9]。为了改善 Ce6 的水溶性, 提高其声动力治疗效果, 本课题组前期通过利用聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰四氧化三铁 (Fe_3O_4) 纳米粒子 (PION), Ce6 负载于纳米粒子合成 PION@E6, 并在肝癌细胞中证明纳米粒子具有增强 Ce6 声敏的作用^[8]。但 PION@E6 介导的 SDT 对非肝癌细胞及动物水平上是否比 Ce6 均具有增敏效应有待深入研究。胶质瘤由于其高度的异质性和侵袭性, 术后的复发率较高^[10]。虽然放疗已在临床上得到广泛应用, 但其对正常脑组织会造成不同程度的损伤, 因此在胶质瘤中进一步证明纳米粒子增强声敏疗法具有重要意义。本研究以胶质瘤 U251 细胞及胶质瘤小鼠移植瘤模型为研究对象, 观察 PION@E6 介导的 SDT 对 Ce6 的增效作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系、实验动物、主要试剂及仪器

人胶质瘤 U251 细胞购自 Cobioer 公司。SPF 级别的 BALB/c-nu 裸鼠 [许可证号: SCXK(湘)2019-0004] 购自湖南莱克景达实验动物有限公司。

实验所用声敏剂 Ce6 购自 BOC Sciences 公司。DMEM 培养基、胎牛血清、磷酸盐缓冲液 (PBS)、CCK-8 试剂盒均购自 Gibco 公司, 细胞凋亡检测试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司。

水合物粒径分析仪购自 Brookhaven Instruments

公司, Zeta 电位分析仪购自美国分散科技公司, X 线衍射仪购自瑞典 ARL 公司, 动物活体荧光成像仪及磁共振 (MRI) 等由桂林医学院科学实验中心提供。

1.2 PION@E6 的合成及鉴定

采用高温热解法制备氧化铁纳米粒子。将 1 mmol/L FeCl_2 溶液、6 mmol/L 油酸和 6 mmol/L 油胺添加到 20 ml 十八烯油酸中, 用氮气冲洗介质, 然后加热至 100~120 °C 维持 1 h。后将 2 mmol/L Fe(acac)₃ 添加到上述混合物中, 并加热至 180~220 °C 维持 30 min, 然后继续保持 280~300 °C 30 min 以生成油酸涂层离子。将含有油酸包被离子的混合物冷却至室温后, 向混合物中加入 75 ml 无水乙醇, 通过磁选收集油酸包被离子 (MNP)。通过添加 35 ml 丙酮进一步洗涤 MNP 并离心, 并将最终收集的 MNP 沉淀物溶解在 35 ml 氯仿中, 进行以下制备方案: 将 50 mg 的 DSPE-PEG2000 和 10 mg 的 Ce6 溶解于 5 ml 的三氯甲烷中, 并将上述收集的 MNP 加入混合物中。超声分散后, 向混合物中加入 5 ml 去离子水, 然后旋转蒸发以清除三氯甲烷。超声分散冷却至室温后, 收集含 MNP@E6 或 PION@E6 的上清液, 并用微滤和超滤去除聚集物。

用 Zeta 电位分析仪检测 PION@E6 的 Zeta 电位, 粒径分析仪和透射电镜观察和拍摄 PION@E6 的水合粒径及核心粒径, 胶体稳定性分析方法检测 PION@E6 的水溶性和稳定性, 紫外可见分光光度计分析 PION@E6 的紫外可见光吸收光谱。最后, 用 X 线衍射仪分析 PION@E6 的晶体结构。

1.3 细胞培养及分组

胶质瘤 U251 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中贴壁培养, 取对数生长期细胞用于后续实验。

将 U251 细胞接种至 96 孔板中 (4.5×10^7 个/孔), 将其随机分为 6 组, (1) 空白组: 细胞常规培养不做任何处理; (2) Ce6 组: 培养液中加入 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ce6; (3) PION@E6 组: 培养液中加入 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PION@E6; (4) 超声组: 培养液置于 480 J/cm^2 超声波中 24 h; (5) Ce6 声动力组: 培养液中加入 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ce6 培养 12 h, 后

用 0.4 W/cm^2 的超声波治疗 20 min; (6) PION@E6 声动力组: 培养液中加入 $50 \mu\text{g/ml}$ PION@E6, 培养 12 h, 后用 0.4 W/cm^2 的超声波治疗 20 min。各组细胞均培养 24 h 后, 进行后续实验。

1.4 CCK-8 法检测 U251 细胞的增殖能力

取各组 U251 细胞悬液至 96 孔板 (4.5×10^7 个/孔) 中, 每组设置 5 个复孔, 向每孔中加入 $10 \mu\text{l}$ 的 CCK-8 溶液, 用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度 (D) 值。实验重复 3 次。

1.5 流式细胞术检测 U251 细胞的凋亡水平

取各组 U251 细胞悬液至 6 孔板 (4.5×10^7 个/孔) 中, 每组设 5 个复孔, 用不含 EDTA 胰酶消化离心管收集后, 于 $1\,000 \times g$ 离心 5 min 收集细胞。每管加入 $100 \mu\text{l}$ 的 $1 \times$ 结合缓冲液悬浮细胞, 在避光条件下每管加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 并混匀, 避光下每管再加入 $5 \mu\text{l}$ PI 并混匀, 孵育 15 min 后, 每管加入 $400 \mu\text{l}$ 的 $1 \times$ 结合缓冲液, 混匀后采用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。实验重复 3 次。

1.6 DCFH-DA 探针法检测 U251 细胞中 ROS 的水平

各实验组细胞孵育 12 h 后, 在避光条件 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下, 用 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 培养 30 min, PBS 清洗 3 次后, 使用荧光酶标仪检测 (激发光波长为 485 nm 、发射光波长为 530 nm)。实验重复 3 次。

1.7 裸鼠胶质瘤 U251 细胞移植瘤模型的构建及观察

在每只裸鼠腋窝皮下注射对数生长期的 U251 细胞 (4.5×10^7 个), 在移植瘤体积约为 270 mm^3 时开始进行体内实验。每组实验裸鼠随机分组 ($n=6$), 用动物活体荧光成像法和 MRI 检测 PION@E6 及 Ce6 在 U251 荷瘤小鼠肿瘤内的分布。实验组每只荷瘤裸鼠经尾静脉注射 0.2 ml 的 PION@E6/Ce6 (1 mg/kg), 对照组尾静脉注入 0.2 ml 生理盐水, 注射后 1、4、8、16、32 h 后, 进行裸鼠体内荧光成像及 MRI。在 4 h 时, 取肿瘤、心、肺、肝、脾和肾等进行荧光活体成像观察。

1.8 体内联合抑瘤实验检测 PION@E6 对裸鼠 U251 细胞移植瘤的影响

体内实验分为 6 组 (6 只/组): (1) 空白组: 荷瘤小鼠常规培养不做任何操作; (2) Ce6 组: 尾静脉注射 $50 \mu\text{g/ml}$ Ce6; (3) PION@E6 组: 尾静脉注射 $50 \mu\text{g/ml}$ PION@E6; (4) 超声组: 480 J/cm^2 超声波处理瘤块; (5) Ce6 声动力组: 尾静脉注射 $50 \mu\text{g/ml}$ Ce6 后, 4 h 时进行声动力治疗; (6) PION@E6 声动力组: 尾静脉注射 $50 \mu\text{g/ml}$ PION@E6, 4 h 时进行声动力治疗。每组动物连续喂养 28 d, 每周用游标卡尺测量移植瘤的大小, 包括最大直径 (a) 和最小直径 (b), 按以下公式计算移植瘤体积: $V = a \times b^2 / 2$ 。第

28 天时处死动物并观察移植瘤体积的变化及对荷瘤小鼠生存的影响。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析。呈正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 合成的纳米粒子 PION@E6 具有良好的水溶性和稳定性

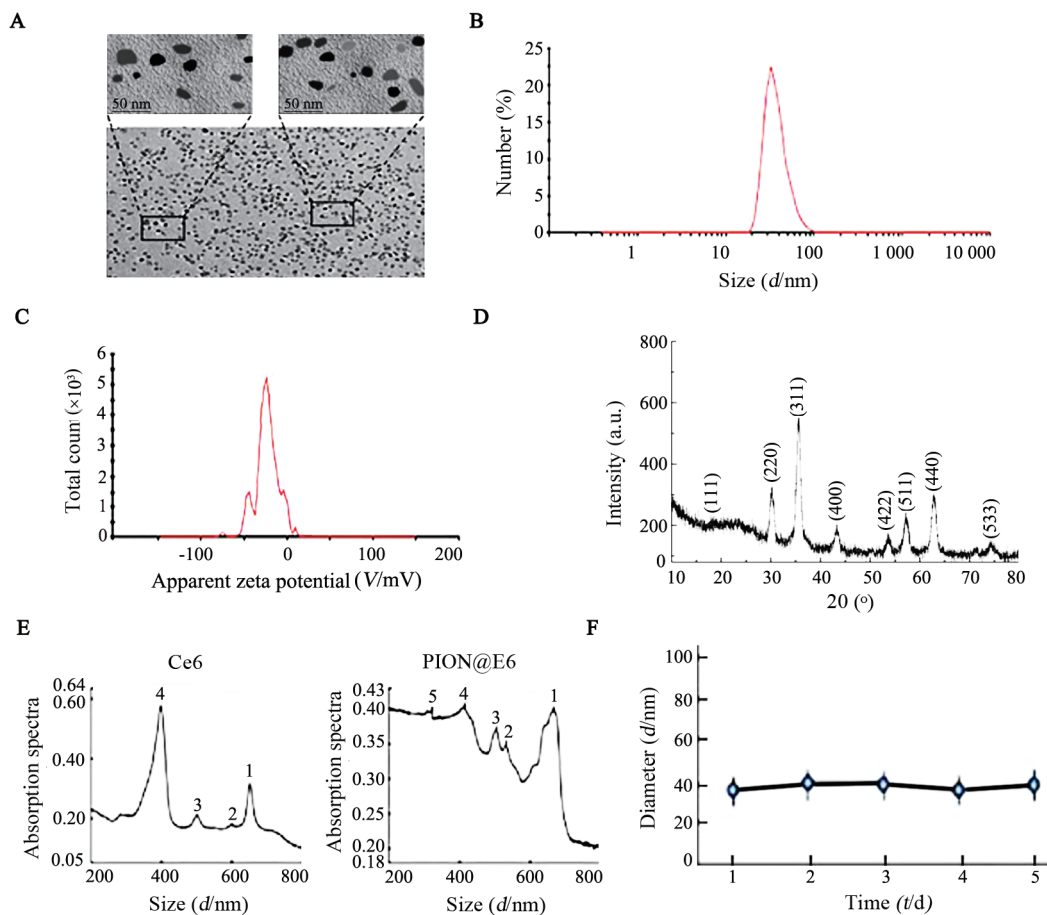
透射电镜 (图 1A) 及水合粒径仪 (图 1B) 检测结果显示, PION@E6 的核心粒径和水合粒径分别为 (10 ± 3.4) nm 和 (37.86 ± 12.90) nm。PION@E6 的 Zeta 电位 (图 1C) 为 23.8 mV 。X 线衍射图谱 (图 1D) 显示了 Fe_3O_4 对应的衍射波峰带, 对应的衍射晶面波峰值分别是 220° 、 311° 、 400° 、 422° 、 511° 和 440° ; 除了磁性 Fe_3O_4 衍射波峰外, 还可观察到 $2\theta = 533^\circ$ 附近有一个较宽的弥散峰, 这是 Ce6 的特征, 进一步说明 Fe_3O_4 颗粒表面可能包覆了 Ce6。紫外可见吸收光谱检测结果 (图 1E) 显示, Ce6 在 400 nm 和 660 nm 有特征峰, PION@E6 在相应波长上同样出现了 Ce6 相同的特征峰, 说明已经 Ce6 已成功负载到 Fe_3O_4 纳米粒子上。胶体稳定性分析 (图 1F) 显示, PION@E6 在蒸馏水中的粒径变化较小, 在 1、2、3、4、5 周时的粒径均为 (37.86 ± 12.90) nm, 表明 PION@E6 具有良好的水溶性和稳定性。结果说明, 已成功地将脂溶性 Ce6 负载到纳米粒子 PION@E6, 其具有良好的水溶性和稳定性。

2.2 PION@E6 声动力处理可提高对 U251 细胞的杀伤力

CCK-8 法和 DCFH-DA 探针法检测结果 (图 2) 显示, PION@E6 与 Ce6 无细胞毒性 (图 2A、B); 单纯超声处理时随着超声强度的增加, 细胞增殖活性显著下降及细胞内 ROS 显著增高 (图 2C、D); 与 Ce6 声动力组相比 (图 2E、F), PION@E6 声动力组 U251 细胞增殖活性显著下降 ($P < 0.05$), 细胞中 ROS 荧光水平显著升高 ($P < 0.05$)。结果表明, PION@E6 声动力处理可显著提高对 U251 细胞的杀伤性, 而且显著提高了细胞内的 ROS 水平。

2.3 PION@E6 声动力处理可显著提高 U251 细胞的凋亡率

流式细胞术检测结果 (图 3) 显示, 与 Ce6 声动力组相比, PION@E6 声动力治疗组细胞凋亡率显著升高 (均 $P < 0.05$)。结果表明, PION@E6 声动力处理可显著提高 U251 细胞的凋亡率。



A: Representative photos of PION@E6 under transmission electron microscope; B: The particle size of PION@E6; C: Zeta potential of PION@E6; D: XRD atlas of PION@E6; E: Comparison of the absorption spectra of PION@E6 and Ce6; F: Colloid stability test of PION@E6 dissolved in deionized water

图1 PION@E6的鉴定

Fig.1 Identification of PION@E6

2.4 PION@E6可延长Ce6在U251移植瘤内的滞留时间

使用荧光活体成像比较PION@E6与Ce6在荷瘤小鼠肿瘤中的滞留时间,结果如图4A所示,经尾静脉注射PION@E6后,在荷瘤小鼠移植瘤中的滞留时间约为32 h,且4 h时的荧光强度达到最强;经尾静脉注射Ce6后,在荷瘤小鼠移植瘤中的滞留时间约为16 h,且4 h时的荧光强度达到最强。结果表明,PION@E6较Ce6在荷瘤小鼠肿瘤组织中的滞留时间长。

使用荧光活体成像观察PION@E6在荷瘤小鼠主要器官的分布情况,结果如图4B所示,经尾静脉注射PION@E6后,与瘤块荧光强度相比,肝的荧光强度最强,肾次之,心、肺和脾几乎无荧光出现。结果表明,PION@E6在体内主要经肝、肾进行代谢。

使用MRI进一步确定PION@E6在荷瘤小鼠肿瘤内的浓度高峰,结果如图4C所示,经尾静脉注射PION@E6后,荷瘤小鼠瘤块组织的滞留时间大约是32 h,且4 h时荧光强度达到最强。实验数据表明,PION@E6在荷瘤小鼠移植瘤组织中的浓度高峰出

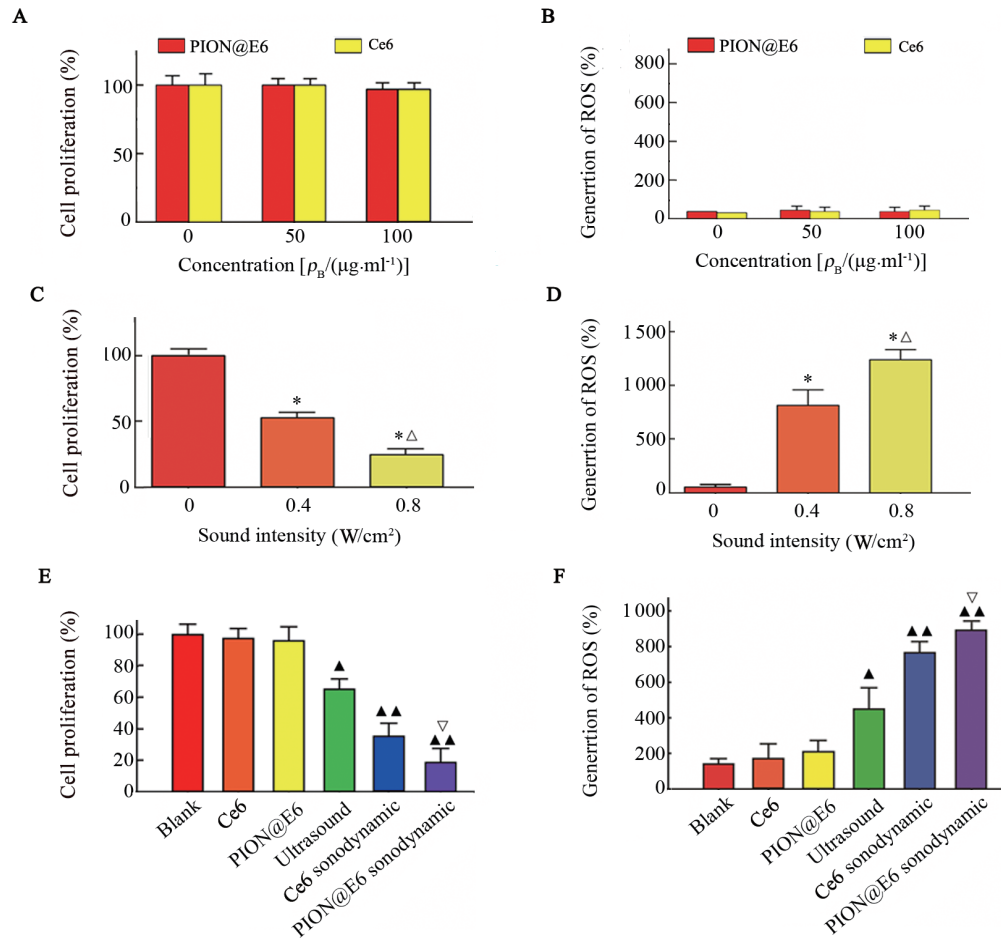
现于注射后4 h前后。

2.5 PION@E6声动力治疗可显著抑制裸鼠U251移植瘤的生长

在各组治疗28 d时统计荷瘤小鼠的存活数和移植瘤的体积。结果(图5)发现,空白组存活的小鼠为1/6、Ce6组为1/6、PION@E6组为2/6、单纯超声组为3/6、Ce6声动力治疗组为4/6、PION@E6声动力治疗组为5/6,PION@E6声动力治疗组小鼠的存活数明显多于Ce6声动力组,移植瘤的体积也显著小于Ce6声动力组($P < 0.01$)。结果表明,PION@E6声动力治疗对移植瘤有更强的抑瘤作用。

3 讨论

PEG具有与各种溶剂的广泛相容性,被广泛应用于各种液体制剂^[11-13]。PION@E6的胶体稳定性实验直接证明了PION@E6具有高度的水溶性。此外,PION@E6的吸收光谱实验证实,Ce6可在纳米粒子上负载。研究结果表明,PION@E6在体内血液循环中具有良好的水溶性,可以被有效地应用于体内外实验中。



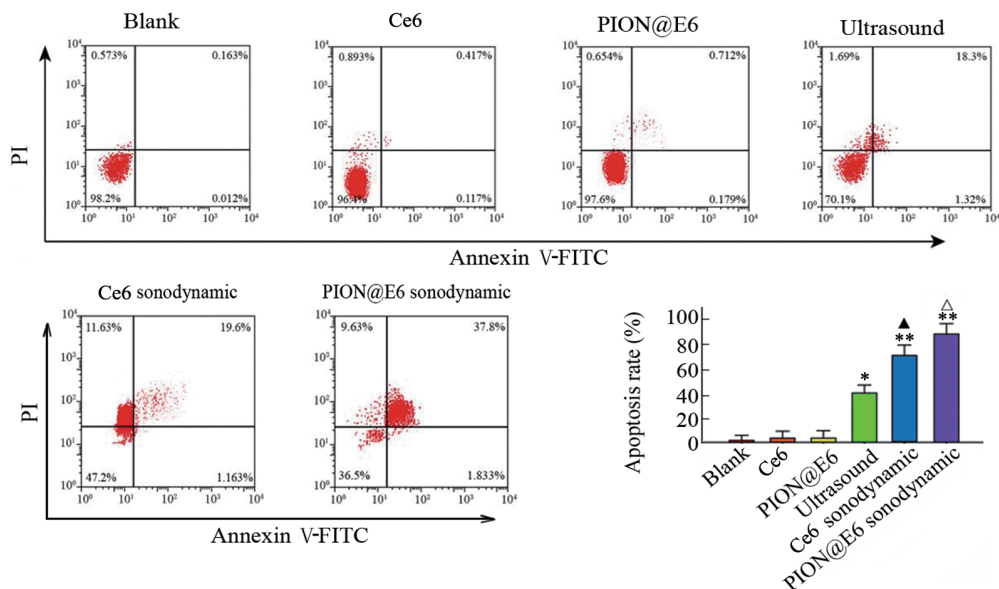
* $P < 0.05$ vs 0 W/cm² group; ^Δ $P < 0.05$ vs 0.4 W/cm² group; [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$ vs Blank group; [▽] $P < 0.05$ vs Ce6 sonodynamic group

A, C and E: The proliferation activity of U258 cells was detected by CCK-8 assay;

B, D and F: The generation of ROS was detected by DCFH-DA probe method

图2 PION@E6、Ce6及其联合超声治疗对U251细胞增殖活力和细胞内ROS生成的影响

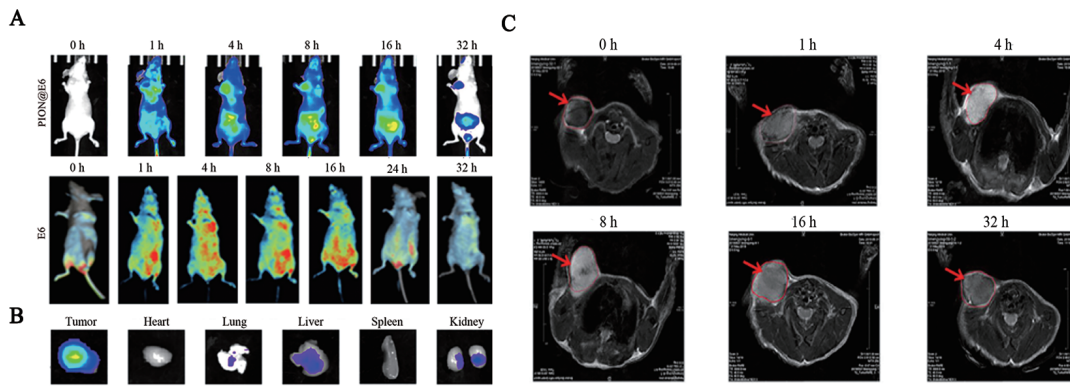
Fig.2 Effects of combined treatment of ultrasound and PION@E6 or Ce6 on the proliferation viability and ROS production in U251 cells



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Blank or Ce6 or PION@E6 group; ^Δ $P < 0.05$ vs Ce6 sonodynamic group; [▲] $P < 0.05$ vs Ultrasound group

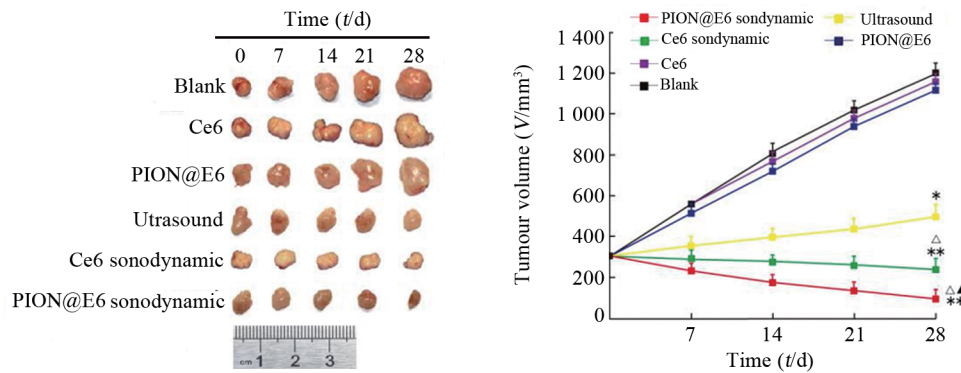
图3 PION@E6声动力处理对U251细胞凋亡的影响

Fig.3 The effect of PION@E6 sonodynamic therapy on apoptosis of U251 cells



A: *In vivo* fluorescence imaging were compared at different time points between PION@E6 and Ce6 groups;
 B: *In vivo* fluorescence imaging were used to analyze the distribution of PION@E6 in major organs;
 C: MRI was used to further determine the peak concentration of PION@E6 in tumor tissues

图4 PION@E6 (1.0 mg/kg)及Ce6 (1.0 mg/kg)在U251 荷瘤小鼠模型中的荧光活体成像和MRI成像
 Fig.4 *In vivo* fluorescence imaging and MRI imaging of U251 cell transplanted tumors in nude mice of PION@E6 (1.0 mg/kg) and Ce6 (1.0 mg/kg) therapy groups



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Blank or Ce6 or PION@E6 group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs Ultrasound group; $^{\blacktriangle}P < 0.05$ vs Ce6 sonodynamic group

图5 PION@E6联合声动力治疗对U251细胞移植瘤小鼠肿瘤体积的影响

Fig.5 The effect of PION@E6 sonodynamic therapy on the tumor size in tumor-bearing mice

体外声动力抗肿瘤实验结果显示, Fe_3O_4 纳米粒子可以增强 Ce6 声动力抑制 U251 细胞的生长。液体中存在的颗粒为超声空化提供成核位点, 从而降低空化阈值。PION@E6 由于纳米颗粒可以作为空化的成核点, 提高空化效率, 其崩塌有助于 Ce6 产生单线态氧, 导致细胞活力受损^[14]。本研究发现, 与 Ce6 声动力治疗组相比, PION@E6 声动力治疗组产生的细胞内 ROS 显著增高, 因此 Fe_3O_4 纳米粒子增强 SDT 治疗效果似乎与 ROS 的产生密切相关。以上结果表明, 在胶质瘤 U251 细胞中 Fe_3O_4 纳米粒子可能通过 ROS 的产生具有增敏 Ce6 声动力的作用。

体内动物实验结果显示, 荷瘤小鼠移植瘤中的 PION@E6 较 Ce6 的滞留时间长。笔者认为, 由于载药纳米颗粒的粒径较小, 一部分载药纳米颗粒很容易逃脱单核细胞吞噬系统的吸收, 使得载药纳米颗粒在体内拥有较长的体内血药循环时间, 这些事实将导致 PION@E6 在血液中拥有较长的循环时间。

实体瘤组织中血管丰富、血管壁间隙较宽、结构完整性差, 造成 PION@E6 颗粒具有选择性、高通透性和滞留性, PION@E6 的肿瘤富集能力依赖于实体瘤的“高通透长滞留”效应^[15-16]。由于人体无法做活体荧光成像, 本研究结果证明 Fe_3O_4 纳米颗粒可用于 MRI^[17], 因此它可以追踪 Fe_3O_4 颗粒在体内最高峰值的聚集时间, 从而确定超声治疗的最佳时间点。本研究结果显示, MRI 结果与动物活体荧光成像结果一致, 进一步证明了 Fe_3O_4 纳米粒子对肿瘤组织的聚集效应。根据荷瘤小鼠的生存结果显示, 通过低频率超声作用下, PION@E6 组的荷瘤裸鼠的存活数明显多于 Ce6 组荷瘤小鼠, 且其肿瘤缩小更加明显。结合动物活体荧光成像实验结果, 这可能部分归因于 PION@E6 比 Ce6 的靶向聚集时间延长, 增加抗肿瘤作用时间, 从而导致 PION@E6 声动力组的荷瘤小鼠瘤块明显比 Ce6 声动力组小, 并且改善了荷瘤小鼠的生存率。上述结果证明, 在荷瘤小鼠

模型中 Fe_3O_4 纳米粒子可以增敏 Ce6 声动力作用。

虽然本研究在胶质瘤 U251 细胞及荷瘤动物模型中证实 Fe_3O_4 纳米粒子可以增敏 Ce6 声动力作用,但是 Fe_3O_4 纳米粒子非多孔结构,无法负载更多药物,且多孔结构的纳米粒子会产生更多的空穴效应,因此下一步研究将采用多孔 Fe_3O_4 -Ce6 复合纳米粒子。总之,体内外实验中均证明, Fe_3O_4 纳米粒子对 Ce6 介导的胶质瘤声动力治疗均具有增效作用。

[参 考 文 献]

- [1] KESSEL D, JEFFERS R, FOWLKES J B, et al. Effects of sonodynamic and photodynamic treatment on cellular thiol levels [J]. *J Photochem Photobiol B*, 1996, 32(1/2): 103-106. DOI: 10.1016/1011-1344(95)07196-2.
- [2] LI Y X, WANG P, WANG X B, et al. Involvement of mitochondrial and reactive oxygen species in the sonodynamic toxicity of chlorin e6 in human leukemia K562 cells[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2014, 40(5): 990-1000. DOI:10.1016/j.ultrasmedbio.2013.11.022.
- [3] 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.
- [4] 陈正和, 陈忠平. 胶质瘤治疗的现状与思考[J]. *广东医学*, 2017, 38(1): 1-2. DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.20170113.001.
- [5] MCHALE A P, CALLAN J F, NOMIKOU N, et al. Sonodynamic therapy: concept, mechanism and application to cancer treatment[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 880: 429-450. DOI: 10.1007/978-3-319-22536-4_22.
- [6] KATO H, FURUKAWA K, SATO M, et al. Phase II clinical study of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 and diode laser for early superficial squamous cell carcinoma of the lung [J]. *Lung Cancer*, 2003, 42(1): 103-111. DOI: 10.1016/s0169-5002(03)00242-3.
- [7] LIU Z, LI J P, CHEN W E, et al. Light and sound to trigger the Pandora's box against breast cancer: a combination strategy of sonodynamic, photodynamic and photothermal therapies[J]. *Biomaterials*, 2020, 232: 119685. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119685.
- [8] ZHANG P, REN Z Y, CHEN Z Q, et al. Iron oxide nanoparticles as nanocarriers to improve chlorin e6-based sonosensitivity in sonodynamic therapy[J/OL]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 4207-4216[2020-11-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6292398/>. DOI:10.2147/DDDT.S184679.
- [9] 刘萍, 于雪峰, 王玉凤, 等. 二氢卟吩类光敏剂在光动力疗法治疗恶性肿瘤中的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(1): 177-180. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2020.01.042.
- [10] LIAO K M, LIN Y Y, GAO W Z, et al. Blocking lncRNA MALAT1/miR-199a/ZHX1 axis inhibits glioblastoma proliferation and progression[J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 388-399 [2020-11-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6819876/>. DOI:10.1016/j.omtn.2019.09.005.
- [11] GREF R, LÜCK M, QUELLEC P, et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2000, 18(3/4): 301-313. DOI:10.1016/s0927-7765(99)00156-3.
- [12] TUZUUTI T, YASUI K, SIVAKUMAR M, et al. Correlation between acoustic cavitation noise and yield enhancement of sonochemical reaction by particle addition[J]. *J Phys Chem A*, 2005, 109(21): 4869-4872. DOI:10.1021/jp0503516.
- [13] 李晨露, 夏芳芳, 章阿敏, 等. 金纳米星负载二氢卟吩 e6 对肺癌 A549 细胞的光动力效应[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(4): 394-400. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.04.013.
- [14] JOSHI B S, ZUHORN I S. Heparan sulfate proteoglycan-mediated dynamin-dependent transport of neural stem cell exosomes in an in vitro blood-brain barrier model[J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(3): 706-719. DOI:10.1111/ejn.14974.
- [15] THAMBI T, YOU D G, HAN H S, et al. Bioreducible carboxymethyl dextran nanoparticles for tumor-targeted drug delivery[J]. *Adv Healthc Mater*, 2014, 3(11): 1829-1838. DOI:10.1002/adhm.201300691.
- [16] THAMBI T, DEEPAGAN V G, YOON H Y, et al. Hypoxia-responsive polymeric nanoparticles for tumor-targeted drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(5): 1735-1743. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.022.
- [17] LEE N, HYEON T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents[J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(7): 2575-2589. DOI: 10.1039/c1cs15248c.

[收稿日期] 2021-01-05

[修回日期] 2021-05-17

[本文编辑] 党瑞山, 沈志超