

· 基础研究 ·

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.06.002

## 中空硫化铜纳米酶脂质复合载体的制备及其联合激光杀伤黑色素瘤 B16-F10 细胞

张梦亚<sup>1a</sup>, 周靖笙<sup>2Δ</sup>, 王震<sup>1b</sup>, 辛仲媛<sup>3</sup>, 徐克豪<sup>2</sup>, 任瑜菲<sup>1a</sup>, 陈翠敏<sup>1a</sup>, 梁浩<sup>1a</sup>, 张停琳<sup>1a</sup>, 高洁<sup>1a,2,3</sup>(1. 海军军医大学长海医院 a. 临床研究中心; b. 肝胆胰外科, 上海 200433; 2. 牡丹江医学院 生命科学学院, 黑龙江 牡丹江 157011; 3. 上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093)

**[摘要]** **目的:** 构建中空硫化铜纳米酶脂质复合载体 CuS@LIP 并探讨其联合激光照射杀伤黑色素瘤 B6-F10 细胞的效果与机制。 **方法:** 构建(2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺-丙烷(氯盐)(DOTAP)阳离子脂质体包被硫化铜纳米载体 CuS@LIP, 研究不同质量浓度的 CuS 与 CuS@LIP 在 1 064 nm 激光照射下的光热性能和热稳定性, 通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)催化活性检测体系检测 CuS@LIP 的类过氧化物活性; 用系列质量浓度梯度的 CuS、CuS@LIP 在有/无激光条件下分别处理 B16-F10 细胞, CCK-8 法检测细胞的存活率, Calcein-AM/PI 染色法、Annexin V-FITC/PI 染色法结合流式细胞仪分别检测 20 μg/mL CuS 或 CuS@LIP 在激光照射或非激光照射条件下对 B16-F10 细胞活力和凋亡的影响。 **结果:** 成功制备的 CuS@LIP 的平均粒径为 (178.23±6.46)nm, 平均 Zeta 电位为 (20.47±0.93)mV; 在激光照射下, 80 μg/mL CuS@LIP 最高温度可达 65.4 °C, 比单纯 CuS 的 63.4 °C 更高; 经 3 个激光开关周期测试, CuS@LIP 终点温度基本保持不变; 此外, CuS@LIP 与 CuS 具有相同的类过氧化物酶催化活性。 低于 20 μg/mL 的 CuS@LIP 在体外对 B16-F10 细胞的增殖活性没有明显影响 ( $P>0.05$ ), 但联合激光照射后细胞存活率明显降低 (29.76±3.60)% vs (87.95±8.18)%,  $P<0.000 1$ , 细胞凋亡率显著升高 [(19.34±4.41)% vs (13.36±0.86)%,  $P<0.01$ ]。 **结论:** 制备的 CuS@LIP 具有符合设计要求的理化性质、良好的光热性能和优异的类过氧化物酶催化活性, 其与激光照射联合后显示出更优异的杀伤 B16-F10 细胞的效果。

**[关键词]** 硫化铜; 阳离子脂质体; 纳米酶; 激光照射; 黑色素瘤; B16-F10 细胞; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R739.5; R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)06-0464-09

## Preparation of liposome coated hollow copper sulfide nano-enzyme and their combined laser irradiation to against melanoma B16-F10 cells

ZHANG Mengya<sup>1a</sup>, ZHOU Jingsheng<sup>2Δ</sup>, WANG Zhen<sup>1b</sup>, XIN Zhongyuan<sup>3</sup>, XU Kehao<sup>2</sup>, REN Yufei<sup>1a</sup>, CHEN Cuimin<sup>1a</sup>, LIANG Hao<sup>1a</sup>, ZHANG Tinglin<sup>1a</sup>, GAO Jie<sup>1a,2,3</sup>(1a. Changhai Clinical Research Unit; 1b. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. College of Life Science, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang, China; 3. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct a hollow copper sulfide nano-enzyme lipid composite nanocarrier CuS@LIP, and to further investigate the effect and mechanism of CuS@LIP combined laser irradiation on killing melanoma B6-F10 cells. **Methods:** (2,3-dioleoyloxy-propyl)-3-trimethylammonium-propane (chloride salt) (DOTAP) cationic liposomes (LIPs) were applied to encapsulate copper sulfide (CuS) to construct cationic liposome-coated copper sulfide nanocarriers (CuS@LIP). The photothermal properties and stability of CuS and CuS@LIP at different concentrations were studied under 1 064 nm laser irradiation. The peroxidase-like activity of CuS@LIP was verified by a catalytic activity detecting system of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and 3, 3', 5, 5' -tetramethylbenzidine (TMB). B16-F10 cells were treated respectively with a series of mass concentration gradients of CuS or CuS@LIP with or without laser. The cell viability of B16-F10 cells was determined *via* CCK-8 assay. Calcein-AM/PI staining and Annexin V-FITC/PI staining combined with flow cytometry detected the effects of 20 μg/mL CuS or CuS@LIP on the cell viability and apoptosis of B16-F10 cells

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 82072051)

**[作者简介]** 张梦亚(1990—), 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事实体瘤术后复发的治疗和组织修复仿生纳米支架材料的研究, E-mail: zhangmengya@smmu.edu.cn; 周靖笙(1995—), 男, 硕士生, 主要从事实体瘤纳米疫苗和仿生纳米材料的研究, E-mail: jasonmail163@163.com.

Δ为共同第一作者

**[通信作者]** 高洁, E-mail: gaojiehighclea@smmu.edu.cn; 张停琳, E-mail: ztl2107@smmu.edu.cn

under laser or non-laser irradiation, respectively. **Results:** The average particle size of successfully prepared CuS@LIP was (178.23±6.46) nm and the average Zeta potential was (20.47±0.93) mV. The highest temperature of 80 µg/mL CuS@LIP under laser irradiation was 65.4 °C, which was higher than that of CuS at 63.4 °C. The endpoint temperature of CuS@LIP was basically unchanged through the cyclic test of three laser on/off switches. In addition, CuS@LIP had the same peroxidase-like catalytic activity as CuS. CuS@LIP had no significant effect on the proliferation activity of B16-F10 cells *in vitro* when it was less than 20 µg/mL ( $P>0.05$ ), but the survival rate was significantly reduced by 58.18% after laser irradiation ([29.76±3.60]% vs [87.95±8.18]%,  $P<0.000 1$ ). The apoptosis rate was significantly increased ([19.34±4.41]% vs [13.36±0.86]%,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** The prepared CuS@LIP has physical and chemical properties, good photothermal properties and excellent peroxidase-like catalytic activity that meet the design requirements, and it shows a better effect of killing B16-F10 cells when combined with laser irradiation.

**[Key words]** copper sulfide; cationic liposome; nano-enzyme; laser irradiation; melanoma; B16-F10 cell; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(6): 464-472. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.06.002]

黑色素瘤是一种起源于黑色素细胞的恶性程度很高的皮肤癌,具有多种病因、高侵袭性、易转移性等特点,其发病率日益升高,预计到2040年,全球新发病例将增加到51万,其中死亡病例约9.6万<sup>[1-3]</sup>。目前黑色素瘤以手术切除为主,辅以放射、化学、靶向和免疫治疗等,近年报道的纳米颗粒载体联合肿瘤免疫治疗因其具有高效、低毒的特点而备受关注。但效果差、易发生耐药,亟需开发新型治疗方法<sup>[2-3]</sup>。新近研发的硫化铜纳米颗粒(以下简称CuS)治疗肿瘤有一定疗效,它有两方面的作用机制:一是光热治疗(photothermal therapy, PTT)导致肿瘤细胞直接死亡或免疫原性细胞死亡(immunogenic cell death, ICD)和释放抗原<sup>[4]</sup>,激活肿瘤免疫反应<sup>[5]</sup>;二是化学动力疗法(chemodynamic therapy, CDT),即在酸性肿瘤环境下Cu<sup>2+</sup>通过芬顿(Fenton)反应催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成活性氧(reactive oxygen species, ROS),从而杀伤肿瘤细胞<sup>[6-8]</sup>。然而,未经修饰的CuS表面活性很高,容易聚合<sup>[9]</sup>,不易进入细胞。阳离子脂质体能被带负电的生物膜吸收,细胞内吞度高、转染效率高且不良反应少<sup>[10]</sup>,已得到了临床试验证实<sup>[11-13]</sup>。本研究构建(2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺-丙烷(氯盐)[(2,3-dioleoyloxypropyl)-3-trimethylammonium-propane (chloride salt), DOTAP]阳离子脂质体(liposome, LIP)包被的CuS纳米载体CuS@LIP,探究其杀伤肿瘤细胞的性能及其机制,为黑色素瘤治疗提供一种具有转化前景的策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、主要试剂及仪器

小鼠黑色素瘤B16-F10细胞购自上海葵赛生物科技有限公司。二水合氯化铜(CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 货号: C111685, 纯度≥99.999%)、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP; 货号: P274371, 高纯级K30)、九水合硫化钠(Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O, 货号: S116078)、胆固

醇(货号: C104032, 纯度≥99%)、DOTAP(货号: D292990, 纯度≥99%)和3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB; 货号: T100415)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,*L*-抗坏血酸(货号: ST1434, 纯度: ≥99.0%)、盐酸多巴胺(dopamine, DA)(货号D103111)、CCK-8细胞增殖试剂盒(货号: C0038)、Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒(货号: C2015M)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号: C1062L)均购自上海碧云天生物技术有限公司,氢氧化钠(货号: S835850)购自上海麦克林生化科技有限公司,氯仿(货号: 10006818, 纯度≥99%)购自国药集团化学试剂有限公司。

马尔文激光粒度仪购自Malvern Instruments Ltd., FC-980-5000-MM 1 064 nm激光器购自上海熙隆光电有限公司, 225S-L24红外热像仪飞础科智慧科技(上海)有限公司, CytoFLEXSRT型流式细胞仪购自贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司。

### 1.2 CuS@LIP的制备

#### 1.2.1 CuS纳米颗粒的合成

CuS纳米颗粒的合成方法参考文献[14-15]。将反应中29.4 µL NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O(30%)替换为1.5 mL 0.2 mol/L的NaOH;此外,在加入Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O水溶液前加入1 mL 0.1 mol/L *L*-抗坏血酸。

#### 1.2.2 CuS@LIP的合成

脂质体薄膜制备方法参考文献[16-17],对其中的配方比例进行了简化,实验中仅加入胆固醇与DOTAP,两者的质量比为2:1。然后,在制备好的脂质体薄膜中加入5 mL上述制备的1 mg/mL的CuS水溶液,完全混合均匀后转移至15 mL离心管中,在60 °C水浴中超声处理30 min,得到CuS@LIP。

### 1.3 CuS@LIP光热性能的检测

首先,通过紫外-可见分光光度计对CuS纳米颗粒水溶液与CuS@LIP溶液进行光谱扫描,确定其在近红外二区(near-infrared second region, NIR-II)

具有明显的吸收;其次,根据前期研究结果<sup>[14]</sup>选择在 0.9 W/cm<sup>2</sup>近红外 1 064 nm 激光照射的条件下,对不同质量浓度(10、20、40、60 和 80 μg/mL)的 CuS 溶液与 CuS@LIP 溶液照射 600 s,检测纳米载体对光热性能(升温情况)的影响。最后,通过在 0.9 W/cm<sup>2</sup>近红外 1 064 nm 激光照射的条件下,对 40 μg/mL 的 CuS@LIP 进行 3 个加热与冷却周期循环的激光开关测试,验证 CuS@LIP 的光热稳定性。

#### 1.4 分光光度法检测 CuS@LIP 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的催化活性

精确称取 24.034 mg TMB 置于 15 mL 离心管中,加入乙醇至 10 mL 刻度线,配制成 10 mmol/L 溶液备用;取 30 μL 10 mmol/L TMB、20 μL 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为反应底物,20 μL 0.1 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲溶液(pH4.0)或 1 mg/mL 的 CuS 溶液,再加入 0.1 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲溶液(pH4.0)配制为 1 mL 溶液。在 2、4、6、8、10、15、20、30 min 等时间点测量紫外-可见光吸收曲线,待 652 nm 处光密度(D)值曲线趋于平台时,记录反应时间。

取 30 μL 10 mmol/L TMB、20 μL 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为反应底物、20 μL 0.1 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲溶液(pH4.0)或 1 mg/mL 的 CuS 或 CuS@LIP 溶液,再加入 0.1 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲溶液(pH4.0)配制为 1 mL 溶液。反应 15 min,加入不同浓度(10、20、50、200 μmol/L)的盐酸 DA 后测量并绘制紫外-可见光吸收光谱曲线<sup>[18]</sup>。

#### 1.5 B16-F10 细胞的培养

小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞在 DMEM 培养基[含 10% 胎牛血清和双抗(100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素)]中,置于 5%CO<sub>2</sub>、湿度 70% 的培养箱中培养,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化和传代。

#### 1.6 CCK-8 法测 CuS@LIP 对 B16-F10 细胞的杀伤能力

将 B16-F10 细胞按 (0.4~0.8)×10<sup>4</sup> 个/孔接种至 96 孔板,并在 37 °C 下培养 24 h。之后,将一系列具有不同质量浓度梯度的 CuS 或 CuS@LIP 溶解在细胞培养基中,37 °C 下转移到每个孔中,每浓度点设 3 个平行孔,培养 24 h 后,用 PBS 对细胞进行洗涤。再于每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂,在 37 °C 下培养 1.5 h。之后,用酶标仪检测波长 450 nm 处的 D 值,通过曲线拟合得到硫化铜浓度与细胞增殖活性的曲线与计算公式。根据细胞活性在 90% 时,计算对应的浓度,作为细胞毒性实验的浓度。再按照上述步骤接种 B16-F10 细胞于 96 孔板,在 37 °C 下培养 24 h,随后在每孔中加入不同质量浓度(0、2、4、6、8、10、12、14、16、20 μg/mL)的 CuS 与 CuS@LIP 溶液,进行激光照射或者非光照射处理后,再培养 24 h。按照下述公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组}D\text{值} - \text{空白对照组}D\text{值}}{\text{对照组}D\text{值} - \text{空白对照组}D\text{值}} \times 100\%$$

#### 1.7 流式细胞术(Annexin V-FITC/PI 双染法)检测 CuS@LIP 对 B16-F10 细胞凋亡的影响

方法参考文献[19]。将 1×10<sup>6</sup> 个 B16-F10 细胞接种在 35 mm 培养板中,设 3 个平行孔,在 37 °C 下培养 24 h,用 20 μg/mL 的 CuS 或 CuS@LIP 处理细胞过夜,用胰酶消化细胞,用 PBS 洗涤。将细胞悬浮在制造商提供的缓冲液(0.5 mL)中,并与 Annexin V (5 μL) 和 PI(10 μL)在 37 °C 下反应 10 min。使用流式细胞术测定凋亡细胞的百分率。

#### 1.8 Calcein-AM/PI 染色法检测 CuS@LIP 对 B16-F10 细胞的杀伤能力

将 B16-F10 细胞以每孔 5×10<sup>4</sup> 个的密度接种在 24 孔板中,设 3 个平行孔,在 37 °C 下培养过夜。然后,用 20 μg/mL 的 CuS 和 CuS@LIP 处理细胞 24 h。B16-F10 细胞在 1 064 nm 激光(0.9 W/cm<sup>2</sup>)下照射 10 min。1 h 后,用含 Calcein-AM 的培养基染色,37 °C 反应 20~25 min,用 PI 原液染色,室温避光染色 5 min,在倒置荧光显微镜下观察。

#### 1.9 统计学处理

采用 Origin Pro 2021、GraphPad Prism 8 软件处理数据与图像,所有实验均独立重复 3 次。符合正态分布的计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,单因素方差分析用于多组间的比较,进一步组间比较采用 one-way ANOVA 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 CuS 和 CuS@LIP 纳米颗粒均具有符合设计要求的理化性质

在温和条件下采用沉淀法成功制备了 CuS 纳米颗粒,通过透射电镜观察其形状和大小,结果(图 1)显示,CuS 纳米颗粒的粒径为 80~100 nm,为近似圆形的中空结构,尺寸较为均匀,分散性较好。这与先前研究合成的 CuS 粒径在 50 nm<sup>[15]</sup>与 178 nm<sup>[14]</sup>相比,尺寸介于两者之间,证明本研究利用沉淀法成功合成了 CuS 纳米载体。

通过薄膜水化法成功制备了脂质体包被的 CuS@LIP,采用马尔文粒径仪对 CuS 及 CuS@LIP 的水合粒径(图 2A)及 Zeta 电位(图 2B)进行测试,得出 CuS 和 CuS@LIP 的平均水合粒径分别为 (107.33±1.12) 和 (178.23±6.46) nm,两者平均 Zeta 电位分别为 -(17.60±0.70) 和 (20.47±0.93) mV。与单纯的 CuS 相比,CuS@LIP 的粒径增加了约 70 nm,变为带正电的纳米载体。由于细胞膜带负电,因此,CuS@LIP 可以通过静电吸引效应提高 CuS 被细胞内

吞的效率。

## 2.2 CuS与CuS@LIP具有良好的光热性能

为进一步证明硫化铜已经合成成功,通过紫外-可见分光光度计对其进行紫外光谱扫描分析。CuS紫外吸收光谱(图3A)显示,在NIR-II(960 nm以上)有强的紫外吸收,同时可证明其具有NIR-II光吸收的功能。因此,在验证纳米载体光热性能时,利用NIR-II的1 064 nm激发光对其进行照射。对CuS@LIP持续照射600 s,绘制并分析光热图与升温曲线发现,相比于超纯水组,不同质量浓度的CuS@LIP在0.9 W/cm<sup>2</sup>功率辐射下,溶液温度均呈现先快速升高、后缓慢升高、最后趋于稳定的升温趋势(图3D);溶液中CuS的浓度越高,其升温速度越快且终点温度越高,CuS组的质量浓度为80 μg/mL时,最高温度可达65.4 °C;相比于单纯的CuS纳米载体,CuS@LIP的升温速度更快,且终点温度更高,显

示出良好的光热性能(图3B)。另外,经1 064 nm激光3次开与关的循环照射,温度变化曲线(图3C)显示,CuS@LIP终点温度基本保持不变,证明其有良好的光热稳定性。

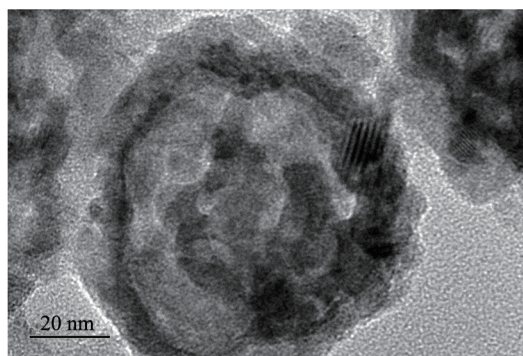
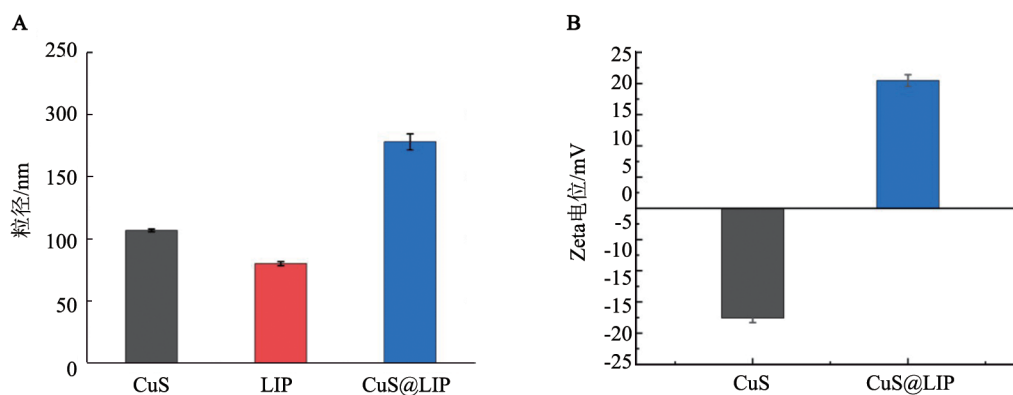


图1 中空CuS纳米载体的透射电镜图



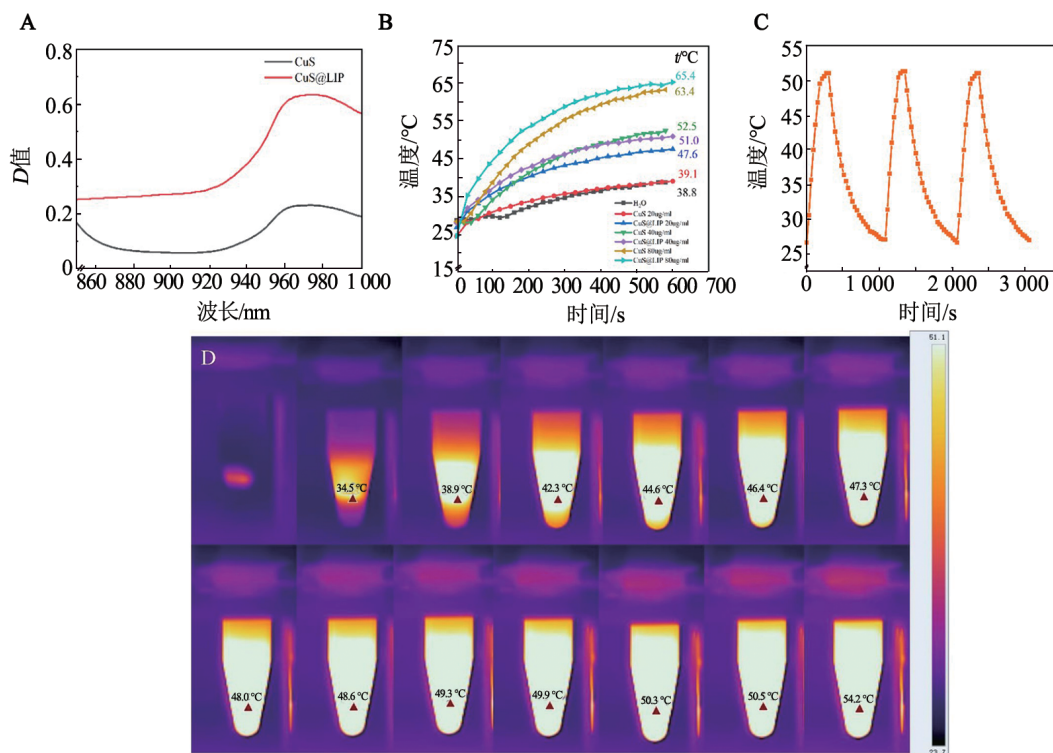
A: CuS、LIP与CuS@LIP的粒径;B:CuS与CuS@LIP的表面电荷。

图2 脂质体包被制备的CuS@LIP纳米颗粒的粒径与表面电荷( $n=3$ )

## 2.3 CuS与CuS@LIP均具有良好的类过氧化物酶催化活性

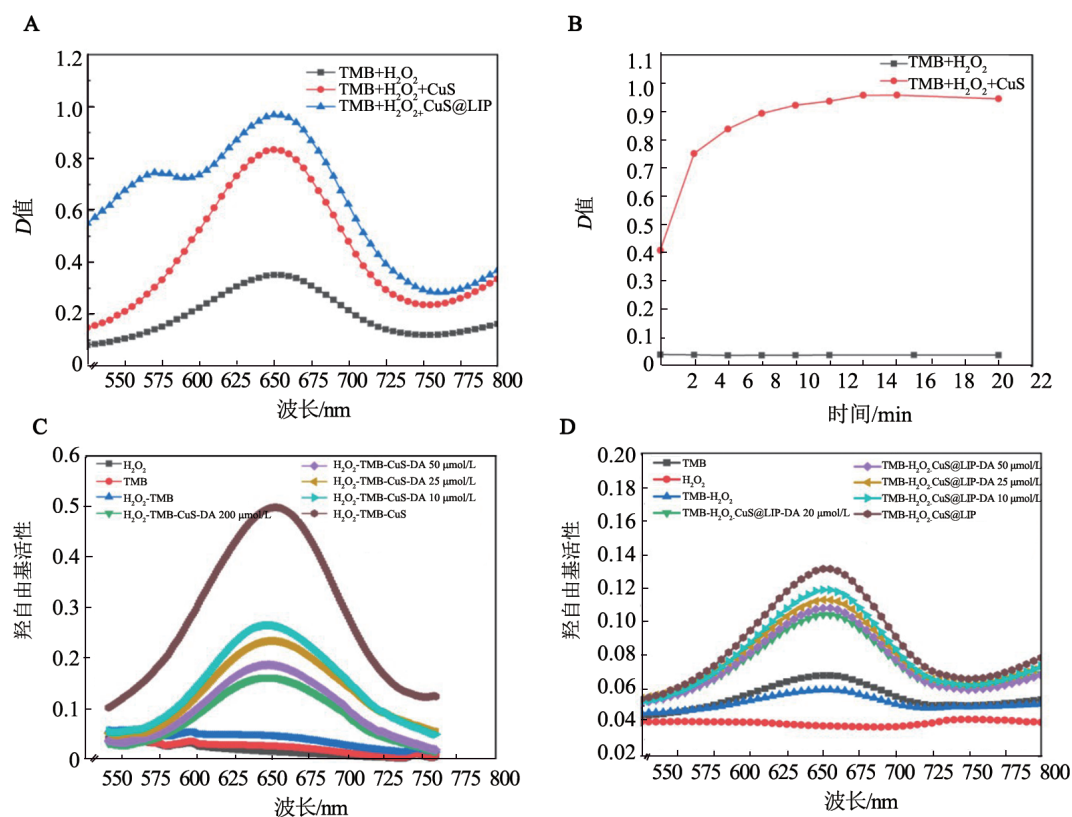
为了研究CuS与CuS@LIP的过氧化物酶活性,尤其是类过氧化物酶活性,采用紫外/可见光谱来检测其催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生羟自由基( $\cdot$ OH)的能力,进而验证其催化活性。自由基氧化理论认为在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>介导的氧化反应中羟基自由基被认为能保持高活性,从而能够迅速氧化无色的TMB而形成蓝色的氧化TMB(oxTMB),且在652 nm处具有明显的紫外吸收特征峰<sup>[18]</sup>。通过紫外/可见吸收信号变化能证明羟自由基的形成。同时,由于DA的氨基和酚羟基可以通过氧化还原反应消耗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,从而抑制了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对TMB的预氧化,而DA可以将蓝色oxTMB还原为TMB,从而使得在652 nm处发生蓝色褪色和D值下降<sup>[20-21]</sup>。

如图4所示,TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CuS与TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CuS@LIP体系在652 nm处D较不含CuS的对照组TMB或H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>大大增强(图4A),且D随处理时间的增加而增加,在20~30 min范围内D趋于稳定而有轻微下降趋势,20 min时D最强,达到平台(图4B)。因此,在加入盐酸DA前TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CuS体系的最佳反应时间约为20 min。加入盐酸DA后,TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CuS与TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CuS@LIP体系D均有明显降低,随着DA的浓度升高,D值加剧下降,降低的D与盐酸DA浓度成正比。因此,CuS与CuS@LIP在介导H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生活性氧基团中展现了优异的类过氧化物酶活性纳米酶性能,其被细胞内吞后能产生内源性羟自由基,直接杀伤肿瘤细胞。此外,还可能作为一种良好的化学发光标记物,应用于生物分子检测的传感平台<sup>[22-23]</sup>。



A: CuS 和 CuS@LIP 的紫外吸收光谱; B: CuS 与 CuS@LIP 在激光照射下的升温曲线; C: 在激光照射下, 经过 3 个周期激光开关循环照射下 CuS@LIP 表现出的光热稳定性; D: CuS 与 CuS@LIP 在近红外 1 064 nm 激光照射下的热成像图。

图3 CuS 与 CuS@LIP 分别在近红外 1064 nm 激光(0.9 W/cm<sup>2</sup>)照射下表现出的光热性能



A: TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+CuS 体系在 652 nm 处的 D 值与反应时间的曲线; B: TMB、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+CuS、TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+CuS@LIP 的紫外-可见光谱图; C: 经不同浓度盐酸 DA 降解 TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+CuS 体系中羟自由基的检测; D: 经不同浓度(μmol/L)盐酸 DA 降解 TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+CuS@LIP 体系后羟自由基的检测。

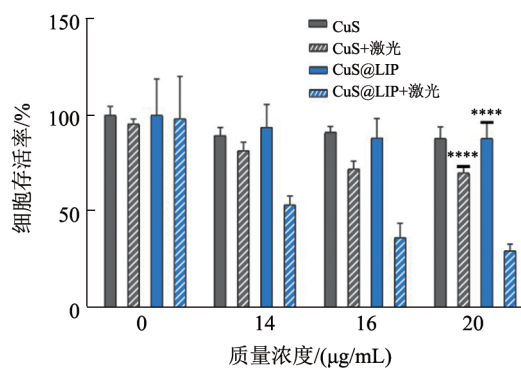
图4 CuS 与 CuS@LIP 纳米颗粒的类过氧化物酶催化活性

## 2.4 CuS 或 CuS@LIP 联合激光照射对 B16-F10 细胞的杀伤作用

CCK-8 法检测以 0~20  $\mu\text{g/mL}$  的 CuS 或 CuS@LIP 联合激光照射处理 B16-F10 细胞的结果(图5)显示,非联合激光照射组的细胞增殖水平没有显著改变,但联合激光照射组细胞存活率随 CuS@LIP 浓度增加而降低。尤其是当 CuS@LIP 质量浓度在 20  $\mu\text{g/mL}$  时,联合激光组比非联合激光组的细胞存活率显著降低[(29.76 $\pm$ 3.60)% vs (87.95 $\pm$ 8.18)%],说明了 20  $\mu\text{g/mL}$  CuS@LIP 联合激光照射具有明显的光热杀伤效果。此外,不论是否加激光处理,CuS@LIP 组都比 CuS 组有更为明显的杀伤效果,说明利用阳离子脂质体对 CuS 进行包被与表面修饰,能够增加细胞内吞的效果,从而使 CuS@LIP 表现出更好的杀伤效果。

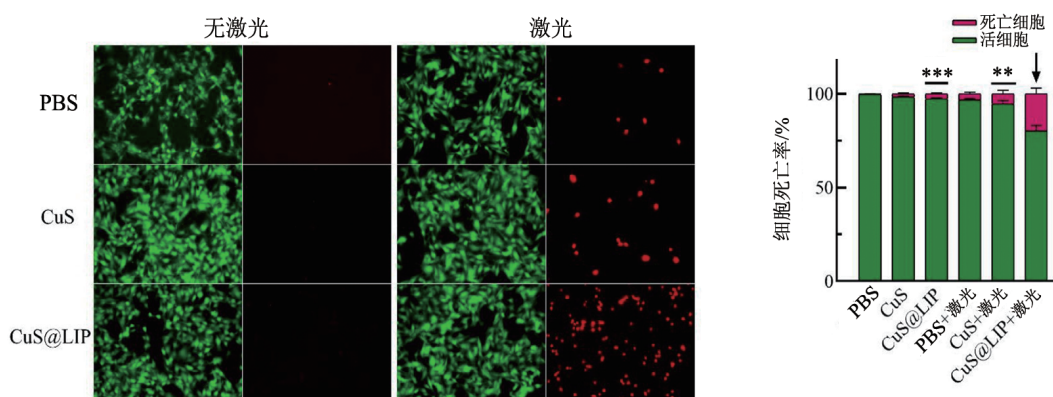
采用 Calcein-AM/PI 试剂盒进一步评估 20  $\mu\text{g/mL}$  CuS、CuS@LIP 在激光照射与非激光照射下对体外细胞的杀伤效果,结果(图6)显示,在未联合激光照

射时,CuS@LIP 组 B16-F10 细胞死亡比例与 CuS 组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ );而联合激光照射后,CuS@LIP 组死亡细胞占比较未联合激光照射的 CuS@LIP 组、联合激光照射处理的 CuS 组均显著升高( $P<0.01$  或  $P<0.001$ )。以上结果表明,CuS@LIP 联合激光照射对 B16-F10 细胞具有显著的杀伤效果。



与 CuS@LIP+激光组相比,\*\*\*\* $P<0.0001$ 。

图5 在有/无激光照射条件下 CuS 或 CuS@LIP 对 B16-F10 细胞增殖活性的影响



与 CuS@LIP+激光组相比,\*\* $P<0.01$ ;\*\*\* $P<0.001$ 。

图6 CuS@LIP 联合激光照射能够有效杀伤 B16-F10 细胞(Calcein-AM/PI 染色法, $\times 200$ )

流式细胞术(Annexin V-FITC/PI 双染法)检测结果(图7)显示,与非联合激光组比较,联合激光的 PBS 组、CuS 组、CuS@LIP 组的 B16-F10 细胞凋亡率均升高,而 CuS@LIP 联合激光组的细胞凋亡率[(19.34 $\pm$ 4.41)%]比 CuS@LIP 组[(13.36 $\pm$ 0.86)%]和 CuS 联合激光组[(14.95 $\pm$ 0.72)%]均有明显提高(均  $P<0.01$ )。

## 3 讨论

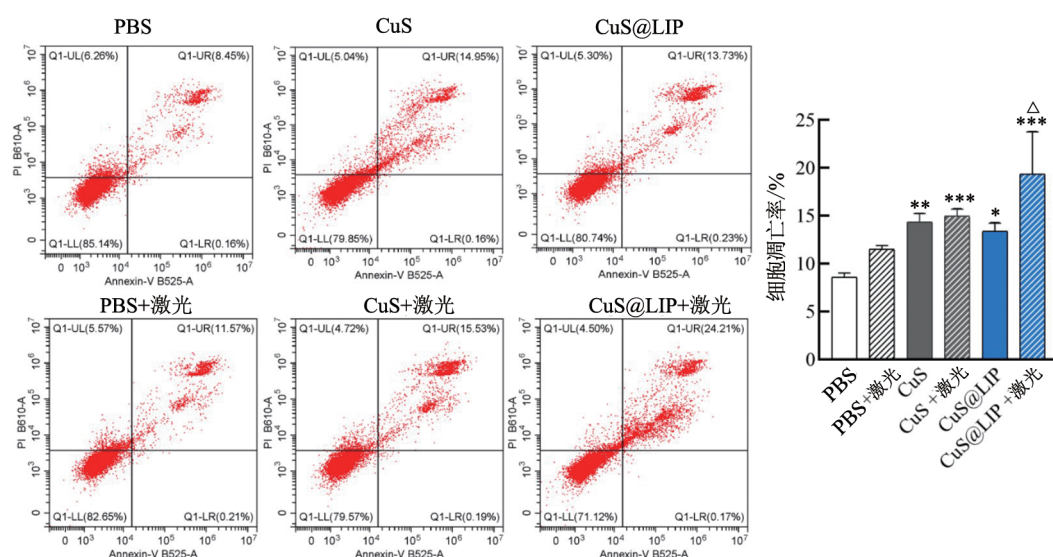
### 3.1 阳离子脂质体修饰 CuS 导致纳米载体电荷反转而粒径依然均一

无机纳米载体是具有独特物理、化学和生物学性质的纳米药物载体,其具有以下特点:易于合成,具有可控的纳米形状与尺寸,以及较大的比表面积

和优异的光、电、热性能。在药物递送方面,无机纳米载体的较大比表面积能显著提升其载药能力,且其能改变药代动力学。与传统化疗相比,无机纳米载体具有延长化疗药物的血浆半衰期的特征<sup>[24]</sup>。由于具有增强渗透和滞留效应,无机纳米载体在肿瘤的蓄积要显著高于正常组织<sup>[25]</sup>。此外,无机纳米载体由于自身具有优异的光、电、磁、催化等性质,在光动力、光热、磁热和化学动力等手段联合治疗中备受关注。CuS 是纳米尺度的铜基金属硫化物,其制备方法与工艺较多<sup>[26]</sup>。合成方法包括沉淀法、固相法<sup>[27]</sup>、水热法<sup>[28]</sup>、溶剂热法<sup>[29]</sup>、乳液法、微波加热法<sup>[30]</sup>和喷雾热解法<sup>[31]</sup>等。相比于其他方法,沉淀法具有操作简单、水相反应体系反应温度温和的优点。另外,均相沉淀法可以通过改变沉淀剂加入的速度与浓度,控制

纳米载体的析出,且合成的纳米载体粒径均一。具有中空结构的CuS因优异的NIR-II光热性能而作为光热剂被广泛应用于肿瘤治疗研究,具有良好的光热治疗效果<sup>[14,32]</sup>。然而,其存在内吞效率低、缺乏长循环寿命、浓度与毒性难以调控、生物利用度低等问题<sup>[33]</sup>,治疗效果不够理想。采用阳离子脂质体包被CuS是改善其性能的有效策略<sup>[34-35]</sup>。德国MediGene公司开发的紫杉醇阳离子脂质纳米载体EndoTAG-1已进入临床III期试验<sup>[13]</sup>,石药集团研制的注射用紫杉

醇阳离子脂质纳米载体已获得中国国家药品监督管理局批准进入临床试验。本研究通过沉淀法合成了粒径均一的CuS,并利用阳离子脂质体对CuS进行包被与表面修饰,形成CuS@LIP,其电荷发生反转的同时粒径仍然均一,Zeta电位从 $-(17.60\pm 0.70)$  mV转变为 $(20.47\pm 0.93)$  mV,粒径为 $(178.23\pm 6.46)$  nm。因此,CuS@LIP可以通过静电吸引被带负电的生物膜高效吸收,增加细胞内生物利用度,同时提高转染效率和减少不良反应<sup>[10]</sup>。



与PBS组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;与CuS组或CuS+激光组或CuS@LIP组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图7 CuS@LIP联合激光照射促进B16-F10细胞的凋亡(流式细胞术检测)

3.2 构建的CuS@LIP维持了原有的类过氧化物催化活性而光热性能更优异

CuS作为一种纳米酶,具有类过氧化物酶活性,催化 $H_2O_2$ 产生ROS,从而可以杀伤肿瘤细胞<sup>[14,36]</sup>。本研究通过实验得出TMB- $H_2O_2$ -CuS与TMB- $H_2O_2$ -CuS@LIP体系在652 nm处 $D$ 较不含CuS与CuS@LIP的对照组TMB或 $H_2O_2$ 明显增强,并且CuS@LIP组的 $D$ 值略高于CuS组,从而说明利用阳离子脂质体对CuS进行包被与表面修饰形成的CuS@LIP保持了CuS原有类过氧化物酶的作用,可以以纳米酶形式催化 $H_2O_2$ 产生ROS。

铜基纳米材料用作光热剂在抑制肿瘤、消除炎症和修复组织方面取得了良好的治疗效果<sup>[37-38]</sup>。本研究发现,在激光照射下80  $\mu\text{g/mL}$  CuS@LIP最高温度可达65.4  $^{\circ}\text{C}$ ,比单纯CuS的63.4  $^{\circ}\text{C}$ 更高,表明CuS@LIP的光热性能更加优良。40  $\mu\text{g/mL}$  CuS@LIP经3个激光开关循环照射,其终点温度基本保持不变,显示出良好的光热稳定性。

综上,阳离子脂质体包被CuS构建的CuS@LIP保持了CuS原有的类过氧化物酶催化活性和光热稳

定性。通过调控阳离子脂质体中胆固醇的含量,调节膜的刚性、厚度、稳定性,可改变脂质膜的渗透性、流动性与有效释放<sup>[39]</sup>。本研究中脂质膜的胆固醇含量约为33%,在保持脂质体膜刚性的同时使膜内外小分子液体如 $H_2O_2$ 能够相互渗透,CuS也可在光热作用下有效释放。因此,CuS@LIP保持了CuS原有的类过氧化物酶催化活性。

3.3 CuS@LIP联合激光照射明显促进对B16-F10细胞的杀伤

在联合1064 nm近红外激光照射下,CuS@LIP对黑色素瘤B16-F10细胞具有显著的杀伤效果,主要归因于三点:一是阳离子脂质体包被显著增加CuS@LIP被细胞内吞的数量;二是CuS@LIP在激光照射下能够产生稳定的光热效应,进而促进肿瘤细胞直接死亡;三是CuS@LIP能够分解类过氧化物产生ROS,通过化学动力学杀伤肿瘤细胞。

此外,CuS能改变肿瘤微环境并激活肿瘤免疫反应<sup>[7]</sup>。脂多糖包裹的CuS可诱导结肠直肠癌CT26细胞凋亡并激活DC<sup>[40]</sup>。表面功能化的CuS介导的光热疗法与抗PD-L1抗体联合作用导致乳腺癌4T1细胞发

生凋亡<sup>[4]</sup>。本研究中流式细胞术检测结果表明, CuS@LIP联合激光治疗较非激光组与单纯CuS组均能显著促进肿瘤细胞凋亡。

综上所述, 本研究结果表明脂质体包被具有纳米酶作用的CuS颗粒制备的CuS@LIP联合激光照射将是一种有效杀伤黑色素瘤细胞的策略。基于其易于制造的工艺, CuS@LIP这一新型载体具有临床转化与规模化应用的潜力。然而, 本研究尚未涉及CuS@LIP和激光联合是否能有效抑制原发性肿瘤的生长及远处肿瘤的生长, 这将是后续研究的方向。

### [参考文献]

- [1] DANCIU C, PINZARU I, CORICOVAC D, *et al.* Betulin silver nanoparticles qualify as efficient antimelanoma agents in *in vitro* and *in vivo* studies[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 134: 1-19. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.11.006.
- [2] BARBASZ A, CZYŻOWSKA A, PIERGIES N, *et al.* Design cytotoxicity: the effect of silver nanoparticles stabilized by selected antioxidants on melanoma cells[J]. *J Appl Toxicol*, 2022, 42(4): 570-587. DOI: 10.1002/jat.4240.
- [3] ARNOLD M, SINGH D, LAVERSANNE M, *et al.* Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040[J]. *JAMA Dermatol*, 2022, 158(5): 495-503. DOI: 10.1001/jamadermatol.2022.0160.
- [4] WANG R P, HE Z S, CAI P J, *et al.* Surface-functionalized modified copper sulfide nanoparticles enhance checkpoint blockade tumor immunotherapy by photothermal therapy and antigen capturing[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(15): 13964-13972. DOI: 10.1021/acsami.9b01107.
- [5] LI X S, LOVELL J F, YOON J, *et al.* Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(11): 657-674. DOI: 10.1038/s41571-020-0410-2.
- [6] WANG Z, NIU J S, ZHAO C Q, *et al.* A bimetallic metal-organic framework encapsulated with DNzyme for intracellular drug synthesis and self-sufficient gene therapy[J]. *Angewandte Chemie Int Ed*, 2021, 60(22): 12431-12437. DOI: 10.1002/anie.202016442.
- [7] LI Z F, WANG C M, CHEN DAI C, *et al.* Engineering dual catalytic nanomedicine for autophagy-augmented and ferroptosis-involved cancer nanotherapy[J/OL]. *Biomaterials*, 2022, 287: 121668[2023-04-11]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121668>. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2022.121668.
- [8] WU W C, YU L D, JIANG Q Z, *et al.* Enhanced tumor-specific disulfiram chemotherapy by *in situ* Cu<sup>2+</sup> chelation-initiated nontoxicity-to-toxicity transition[J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(29): 11531-11539. DOI: 10.1021/jacs.9b03503.
- [9] 黄修杰. 生物质基纳米硫化铜复合功能材料的构建与性能[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- [10] FAN Y N, LI M, LUO Y L, *et al.* Cationic lipid-assisted nanoparticles for delivery of mRNA cancer vaccine[J]. *Biomater Sci*, 2018, 6(11): 3009-3018. DOI: 10.1039/C8BM00908B.
- [11] KUIJTEN M M P, CHEN J W, *et al.* Multimodal targeted high relaxivity thermosensitive liposome for *in vivo* imaging[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17220[2023-04-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4661695/>. DOI: 10.1038/srep17220.
- [12] WANG S, YANG W T, DU H L, *et al.* Multifunctional reduction-responsive SPIO&DOX-loaded PEGylated polymeric lipid vesicles for magnetic resonance imaging-guided drug delivery[J/OL]. *Nanotechnology*, 2016, 27(16): 165101[2023-04-11]. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/16/165101>. DOI: 10.1088/0957-4484/27/16/165101.
- [13] CHEN L T, HITRE E, LEE W J, *et al.* A randomized controlled, open label, adaptive phase III trial to evaluate safety and efficacy of endoTAG-1 plus gemcitabine versus gemcitabine alone in patients with measurable locally advanced and/or metastatic adenocarcinoma of the pancreas failed on FOLFIRINOX treatment[J/OL]. *Ann Oncol*, 2019, 30: v321[2023-04-11]. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdz247.160>. DOI: 10.1093/annonc/mdz247.160.
- [14] XUE X, LIU H, WANG S C, *et al.* Neutrophil-erythrocyte hybrid membrane-coated hollow copper sulfide nanoparticles for targeted and photothermal/anti-inflammatory therapy of osteoarthritis[J/OL]. *Compos B Eng*, 2022, 237: 109855[2023-04-11]. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2022.109855>. DOI: 10.1016/j.compositesb.2022.109855.
- [15] YEC C C, ZENG H C. Synthetic architecture of multiple core-shell and yolk-shell structures of (Cu<sub>2</sub>O@n)Cu<sub>2</sub>O (n=1-4) with centrality and eccentricity[J]. *Chem Mater*, 2012, 24(10): 1917-1929. DOI: 10.1021/cm300672r.
- [16] MIRANDA D, WAN C, KILIAN H I, *et al.* Indocyanine green binds to DOTAP liposomes for enhanced optical properties and tumor photoablation[J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(8): 3158-3164. DOI: 10.1039/c9bm00551j.
- [17] GONG Z R, CHEN D Z, XIE F Y, *et al.* Codelivery of salinomycin and doxorubicin using nanoliposomes for targeting both liver cancer cells and cancer stem cells[J]. *Nanomedicine*, 2016, 11(19): 2565-2579. DOI: 10.2217/nnm-2016-0137.
- [18] ZHU J, PENG X, NIE W, *et al.* Hollow copper sulfide nanocubes as multifunctional nanozymes for colorimetric detection of dopamine and electrochemical detection of glucose[J/OL]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 141: 111450[2023-04-11]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2019.111450>. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111450.
- [19] BERA S, DATTA H K, DASTIDAR P. Nitrile-containing terpyridyl Zn(II) -coordination polymer-based metallogelators displaying helical structures: synthesis, structures, and "druglike" action against B16-F10 melanoma cells[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(21): 25098-25109. DOI: 10.1021/acsami.2c05338.
- [20] DUTTA S, RAY C, MALLICK S, *et al.* A gel-based approach to design hierarchical CuS decorated reduced graphene oxide nanosheets for enhanced peroxidase-like activity leading to colorimetric detection of dopamine[J]. *J Phys Chem C*, 2015, 119(41): 23790-23800. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b08421.
- [21] LIU J, MENG L, FEI Z, *et al.* On the origin of the synergy between the Pt nanoparticles and MnO<sub>2</sub> nanosheets in wonton-like 3D nanozyme oxidase mimics[J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 121: 159-165. DOI: 10.1016/j.bios.2018.08.004.
- [22] HUANG Y, ZHAO M T, HAN S K, *et al.* Growth of Au nanoparticles on 2D metalloporphyrinic metal-organic framework



- nanosheets used as biomimetic catalysts for cascade reactions [J/OL]. *Adv Mater*, 2017, 29(32): 1700102[2023-04-11]. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.201700102>. DOI: 10.1002/adma.201700102.
- [23] ZHU C Z, DU D, LIN Y H. Graphene-like 2D nanomaterial-based biointerfaces for biosensing applications[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 89(Pt 1): 43-55. DOI: 10.1016/j.bios.2016.06.045.
- [24] KUMARI P, GHOSH B, BISWAS S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery[J]. *J Drug Target*, 2016, 24(3): 179-191. DOI: 10.3109/1061186X.2015.1051049.
- [25] BISWAS S, TORCHILIN V P. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 66: 26-41. DOI: 10.1016/j.addr.2013.11.004.
- [26] AIN N U, ABDUL NASIR J, KHAN Z, *et al.* Copper sulfide nanostructures: synthesis and biological applications[J]. *RSC Adv*, 2022, 12(12): 7550-7567. DOI: 10.1039/D1RA08414C.
- [27] ASFARAM A, GHAEDI M, PURKAIT M K. Novel synthesis of nanocomposite for the extraction of Sildenafil Citrate (Viagra) from water and urine samples: process screening and optimization[J]. *Ultrason Sonochemistry*, 2017, 38: 463-472. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2017.03.045.
- [28] YANG X D, LU G W, WANG B Y, *et al.* Synthesis, growth mechanism and photocatalytic H<sub>2</sub> evolution of CdS/CuS composite *via* hydrothermal method[J]. *RSC Adv*, 2019, 9(43): 25142-25150. DOI: 10.1039/c9ra04336e.
- [29] ZHANG J, FENG H J, YANG J Q, *et al.* Solvothermal synthesis of three-dimensional hierarchical CuS microspheres from a Cu-based ionic liquid precursor for high-performance asymmetric supercapacitors[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(39): 21735-21744. DOI: 10.1021/acsami.5b04452.
- [30] LI H, WANG Y H, HUANG J X, *et al.* Microwave-assisted synthesis of CuS/graphene composite for enhanced lithium storage properties[J]. *Electrochimica Acta*, 2017, 225: 443-451. DOI: 10.1016/j.electacta.2016.12.117.
- [31] ZHU Y H, XU Z W, YAN K, *et al.* One-step synthesis of CuO-Cu<sub>2</sub>O heterojunction by flame spray pyrolysis for cathodic photoelectrochemical sensing of l-cysteine[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(46): 40452-40460. DOI: 10.1021/acsami.7b13020.
- [32] WU S L, LIU C C, LI W J, *et al.* Second near-infrared photoactivatable nanomedicines for enhanced photothermal-chemodynamic therapy of cancer[J]. *J Mater Chem B*, 2023, 11(11): 2455-2465. DOI: 10.1039/D2TB02769K.
- [33] QIU S, WU X N, GENG D C, *et al.* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NIR-sensitive "two-step" nano theranostic system based hollow mesoporous copper sulfide/hyaluronic acid/JWH133 as an optimally designed delivery system for multidimensional treatment of RA[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 225: 298-309. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.019.
- [34] KHABAZIAN E, VAKHSHITEH F, NOROUZI P, *et al.* Cationic liposome decorated with cyclic RGD peptide for targeted delivery of anti-STAT3 siRNA to melanoma cancer cells[J]. *J Drug Target*, 2022, 30(5): 522-533. DOI: 10.1080/1061186X.2021.1973481.
- [35] SUN M W, DANG U J, YUAN Y H, *et al.* Optimization of DOTAP/chol cationic lipid nanoparticles for mRNA, pDNA, and oligonucleotide delivery[J/OL]. *AAPS PharmSciTech*, 2022, 23(5): 135 [2023-04-11]. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-022-02294-w>. DOI: 10.1208/s12249-022-02294-w.
- [36] LI X, PAN Y, ZHOU J, *et al.* Hyaluronic acid-modified manganese dioxide-enveloped hollow copper sulfide nanoparticles as a multifunctional system for the co-delivery of chemotherapeutic drugs and photosensitizers for efficient synergistic antitumor treatments[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2022, 605: 296-310. DOI: 10.1016/j.jcis.2021.07.092.
- [37] ZHENG Z Y, YU P, CAO H L, *et al.* Starch capped atomically thin CuS nanocrystals for efficient photothermal therapy[J/OL]. *Small*, 2021, 17(47): 2103461[2023-04-11]. <http://dx.doi.org/10.1002/smll.202103461>. DOI: 10.1002/smll.202103461.
- [38] LIU T F, XIAO B W, XIANG F, *et al.* Ultrasmall copper-based nanoparticles for reactive oxygen species scavenging and alleviation of inflammation related diseases[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2788[2023-04-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32493916/>. DOI: 10.1038/s41467-020-16544-7.
- [39] KADDAH S, KHREICH N, KADDAH F, *et al.* Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 113: 40-48. DOI: 10.1016/j.fct.2018.01.017.
- [40] JANG B, XU L, MOORTHY M S, *et al.* Lipopolysaccharide-coated CuS nanoparticles promoted anti-cancer and anti-metastatic effect by immuno-photothermal therapy[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(62): 105584-105595. DOI: 10.18632/oncotarget.22331.

[收稿日期] 2023-05-10

[修回日期] 2023-06-06

[本文编辑] 黄静怡, 沈志超