

网络出版时间: 2022-09-14 20:49 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220913.1744.001.html>

◇基础医学研究◇

Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构用于肿瘤光热-化学疗法联合治疗

金芊芊¹, 马许可¹, 朱雪瑞¹, 查正宝¹, 钱海生²

摘要 目的 探究 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构在肿瘤光热-化学疗法联合治疗中的应用,为肿瘤治疗方法的研究提供新思路。方法 通过透射电子显微镜等方法对 Zn_xNi_{1-x}S 纳米结构进行表征测试;通过红外热成像仪探究光热性能;通过荧光光谱仪研究了不同温度和不同 pH 条件下 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构的药物释放情况;通过 MTT 实验探究 Zn_xNi_{1-x}S 纳米结构的生物安全性及 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构的体外抗肿瘤性能。结果 所制备的 Zn_xNi_{1-x}S 纳米结构分散性良好且尺寸均一;光热性能测试结果显示 Zn_xNi_{1-x}S 纳米结构具有良好的光热升温效果;Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构的药物释放行为具有温度和 pH 响应性;细胞实验表明 Zn_xNi_{1-x}S 纳米结构对正常细胞无明显毒性,在近红外光照射下 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构能够显著地抑制肿瘤细胞的生长。结论 Zn_xNi_{1-x}S 纳米结构是一种生物相容性良好的纳米材料,在此基础上构建的 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构具有良好的抗肿瘤性能,能够用于肿瘤的光热-化学疗法联合治疗研究。

关键词 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构;光热疗法;抗肿瘤;联合治疗

中图分类号 TQ 462+.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1681-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.001

恶性肿瘤极大地危害着人们的生命健康^[1-3]。传统的癌症治疗方法如外科手术、放疗等均存在一定副作用,无法取得令人满意的治疗效果^[4-6]。近年来,光热疗法(photothermal therapy, PTT)因其高特异性、微创性等优势受到广泛关注。在近红外(near-infrared, NIR)光作用下,PTT 主要利用光热剂将吸收的光能转换成热量,使治疗区域温度升高,从而实现肿瘤组织的消融^[7-8]。PTT 也存在一定的局限性,有必要联合多种方法实现肿瘤的有效治疗。

该研究通过溶剂热法成功合成了 Zn_xNi_{1-x}S 空心纳米结构,基于其优异的光热性能和独特的中空结构,进一步负载阿霉素(doxorubicinol, DOX)得到了 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构,基于光热-化学疗法联合研究其抗肿瘤功效,为探究肿瘤的新型治疗方法提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 紫外-可见分光光度计(U-5100, 日立高新技术公司);荧光光谱仪(FLS980, 英国 Edinburgh 公司);X 射线光电子能谱仪(ESCAL-AB250Xi, 美国 Thermo Scientific 公司);透射电子显微镜(JEM-2100F)、场发射扫描电子显微镜(SU8020)(日本日立公司);酶标仪(ELx800, 美国伯腾仪器有限公司);红外热成像仪(Testo 869, 瑞徽电子上海有限公司)。四水合乙酸镍(C₄H₆NiO·4H₂O)、乙二醇(C₂H₆O₂)均购于上海国药集团化学试剂有限公司;阿霉素(C₂₇H₂₉NO₁₁)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 Zn_xNi_{1-x}S 空心纳米结构的合成 根据已报道的方法制备了 ZnS 纳米球^[7-8] 将其作为模板,通过溶剂热方法合成了 Zn_xNi_{1-x}S 空心纳米球。在 20 ml 乙二醇中加入 ZnS(40 mg),超声 10 min 得到分散均匀的溶液,随后加入 5 ml 乙酸镍(0.64 mmol)的乙二醇分散液,室温搅拌 20 min 后,于高压反应釜中 140 °C 反应 4 h。等待反应结束之后,关闭烘箱,使其自然降温,离心收集产物。

1.3 Zn_xNi_{1-x}S 空心纳米结构的光热性能研究 配制不同浓度的 Zn_xNi_{1-x}S 水溶液(0、30、60、90、120、150 μg/ml) 在 NIR 光照射下(808 nm, 2.0 W/cm², 10 min),使用红外热成像仪(Testo 869)每隔 10 s 记录溶液温度变化并采集对应的红外热成像图片。为了进一步评估激光功率对光热性能的影响,使用不同功率 NIR 光(1.0、1.5、2.0 W/cm²)照射 Zn_xNi_{1-x}S(150 μg/ml)水溶液并记录实时温度变化。

1.4 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构的合成 避光条

2022-05-16 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:52172276)

作者单位:¹合肥工业大学食品与生物工程学院,合肥 230009

²安徽医科大学生物医学工程学院,合肥 230032

作者简介:金芊芊,女,硕士研究生;

钱海生,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: shqian@ahmu.edu.cn

件下,将已合成的 $Zn_xNi_{1-x}S$ 空心纳米球(5 mg)分散在 10 ml DOX 溶液中(5 mg),搅拌 24 h 后,用去离子水洗去未反应的 DOX,离心至上清液无色,冷冻干燥后可得 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米结构。

1.5 DOX 标准曲线测定 使用 10 ml 容量瓶配置一系列浓度的 DOX 水溶液(1、2、3、4、5、6 $\mu\text{g}/\text{ml}$),通过荧光光谱仪测定其荧光强度(激发波长 476 nm,发射波长范围 510~600 nm),通过线性拟合可得到 DOX 标准曲线。

1.6 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 药物释放研究 将 1 ml 的 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 溶液(1×10^3 mg/L)装载于截留分子量为 8 000~14 000 的透析袋中,随后将其置于装有 30 ml 不同 pH 的 PBS(pH = 5.0、6.5、7.4)缓冲液中,于恒温摇床中震荡并在不同时间节点取样,通过荧光光谱仪测量介质溶液荧光强度,从而确定其浓度。此外,还通过改变恒温摇床温度(37、45 $^{\circ}\text{C}$)探究温度对药物释放的影响。为了研究光响应的 DOX 释放行为,将 1 ml 的 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 溶液(1×10^3 mg/L)溶液置于黑暗条件下作为对照组,同时对另一实验组用 808 nm 激光器照射 1 ml 的 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 溶液(1×10^3 mg/L)。每照射 5 min 后将溶液离心,收集上清液测定其荧光强度,随后补充新鲜的 PBS 溶液,重新分散后在黑暗条件下保持相同时间,继续离心收集上清液,重复此操作多次,分析其药物释放效果。

1.7 体外生物安全性评价 使用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)来评价 $Zn_xNi_{1-x}S$ 空心纳米结构的生物安全性。在 96 孔板中,接种处于对数生长期的 HUVECs 细胞(1×10^4 个细胞/孔),在恒温培养箱中孵育 1 d,然后加入不同浓度材料(0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)继续培养 24 h。最后加入 MTT 孵育 4 h,使用 150 μl 二甲亚砜(DMSO)替换上层液体,测量 490 nm 处的吸光度值。

1.8 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米结构的体外抗肿瘤效果检测 以小鼠乳腺癌细胞(mouse breast cancer cells, 4T1)为模型,通过 MTT 实验来评估 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米结构对肿瘤细胞的杀伤能力。操作过程同上。对于光照组,使用 NIR 光照射 3 min($808 \text{ nm } 2.0 \text{ W}/\text{cm}^2$)。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $Zn_xNi_{1-x}S$ 空心纳米结构的形貌表征 扫描电镜图像及透射电镜图像均显示 $Zn_xNi_{1-x}S$ 空心纳米结构分散性良好且尺寸均一,平均直径约为 300 nm,见图 1A、B。扫描透射电子显微镜图像显示, Zn、Ni 和 S 元素均匀的分布在 $Zn_xNi_{1-x}S$ 空心纳米球上,见图 1C~F。

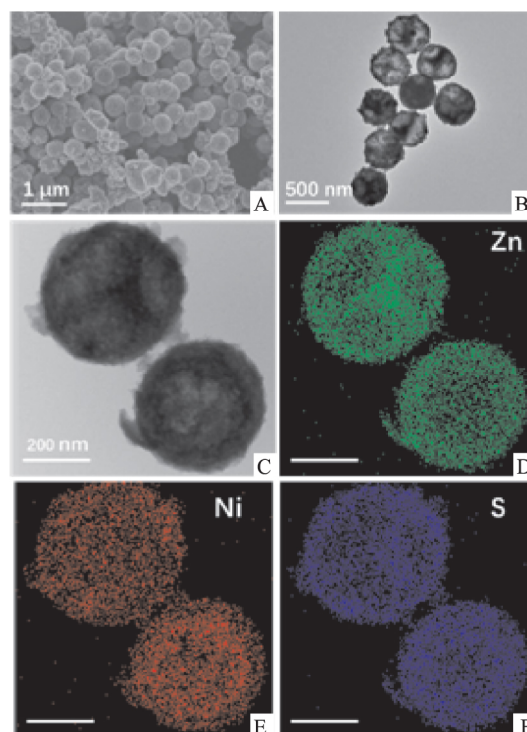


图1 $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米结构的形貌表征

A: $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米结构的扫描电镜图像 $\times 16\ 000$; B: $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米结构的透射电镜图像 $\times 15\ 000$; C: $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米结构的扫描透射电子显微镜图像 $\times 200\ 000$; D: Zn 元素分布图 $\times 200\ 000$; E: Ni 元素分布图 $\times 200\ 000$; F: S 元素分布图 $\times 200\ 000$

2.2 $Zn_xNi_{1-x}S$ 空心纳米结构的粒径测量和元素分析 $Zn_xNi_{1-x}S$ 空心纳米结构的水合粒径约为 317.98 nm,见图 2A。通过 X 射线光电子能谱仪对 $Zn_xNi_{1-x}S$ 中 Ni、Zn 和 S 元素进行分析。Zn 2p 1/2 和 Zn 2p 3/2 轨道分别与 1 043.25 eV 和 1 022.43 eV 处的结合能相对应。874.03 eV 和 857.01 eV 处的结合能分别对应 Ni 2p 1/2 和 Ni 2p 3/2 轨道,并在 881.58 eV 和 863.05 eV 处观察到对应的卫星峰。此外,在 162.21 eV 及在 168.76 eV 处的结合能分别对应 S 2p 轨道及 S-O 键。见图 2B~D。

通过能量色散 X 射线光谱仪(energy dispersive

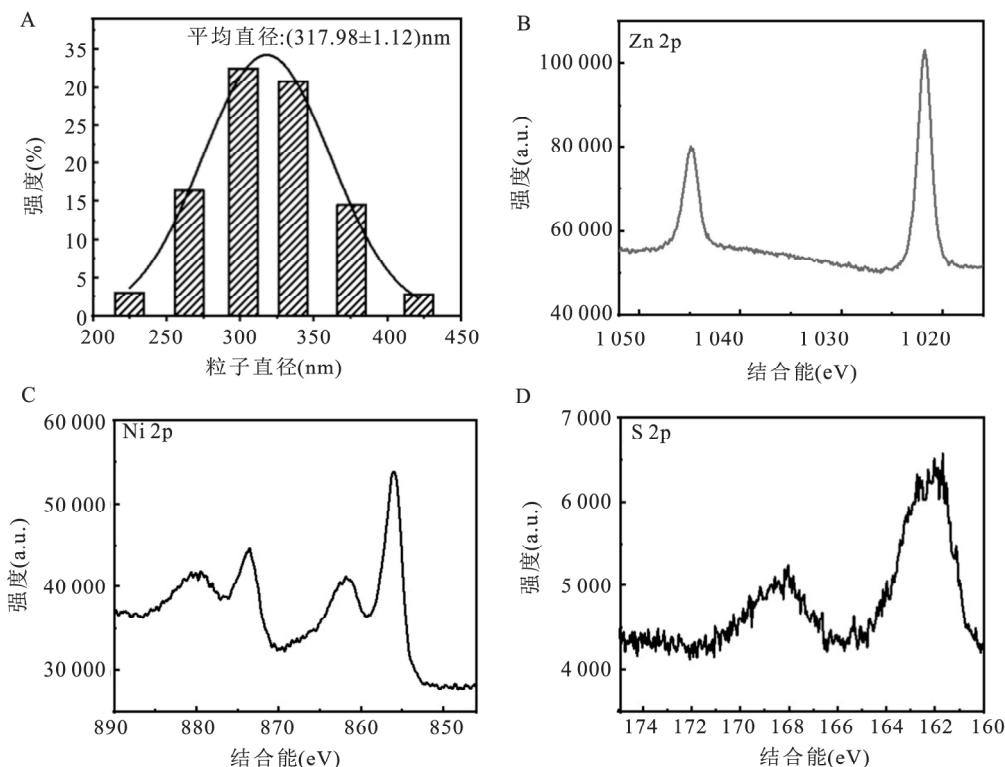


图2 $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米结构的水合粒径分布和元素图谱

A: 水合粒径分布; B: Zn 2p X 射线光电子能谱图; C: Ni 2p X 射线光电子能谱图; D: S 2p X 射线光电子能谱图

X-ray spectroscopy (EDX) 对 $Zn_xNi_{1-x}S$ 中 Ni、Zn 和 S 元素进行测定,结果见图 3。Zn、Ni 及 S 元素均存在于 $Zn_xNi_{1-x}S$ 空心纳米结构中,具体的元素含量见表 1,由此计算可得 Zn : Ni : S 的原子组成百分比约为 1.64 : 1 : 1.78。

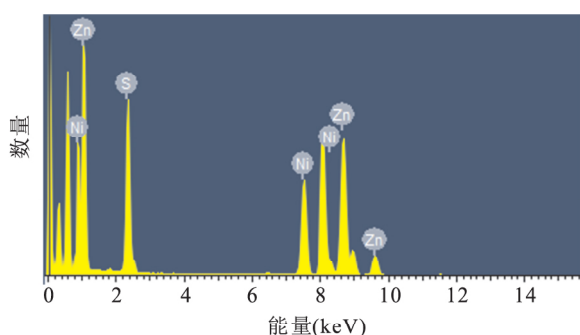


图3 $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米结构的 EDX 能谱

表1 $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米结构的 EDX 元素比例分析 (%)

元素	重量百分比	原子百分比
Zn	48.08	37.10
Ni	26.30	22.60
S	25.62	40.30
总量	100	100

2.3 $Zn_xNi_{1-x}S$ 空心纳米结构光热效应 $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米结构表现出良好的光热升温效果,其光热性能具有浓度依赖性,见图 4A、B。溶液浓度保持不变时(150 $\mu g/ml$),激光功率越大,溶液温度越高,光热效果随着激光功率的增大而增强,见图 4C。

2.4 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米结构的合成 紫外-可见吸收光谱显示, $Zn_xNi_{1-x}S$ 可成功负载 DOX 分子,见图 5A。为了确定载药量,将 $Zn_xNi_{1-x}S$ 和 DOX 反应后离心的上清液收集并测量其荧光强度,并与标准曲线进行比对,见图 5B、C。通过计算可得载药率约为 23.54%。

2.5 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米结构中 DOX 的响应释放 探究了温度和 pH 值对 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米结构中 DOX 释放行为的影响。结果显示,DOX 的释放率随 pH 降低、温度升高而增加。当介质 pH 为 5.0 温度升高至 45 $^{\circ}C$ 时, $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米结构中 DOX 的释放率可达到约 60%,见图 5D、E。接着研究了在 NIR 光驱动下的药物释放行为,在 NIR 激光器打开状态下,DOX 的释放速率明显高于黑暗条件下的释放率,见图 5F。

2.6 $Zn_xNi_{1-x}S$ 空心纳米结构的生物安全性评价

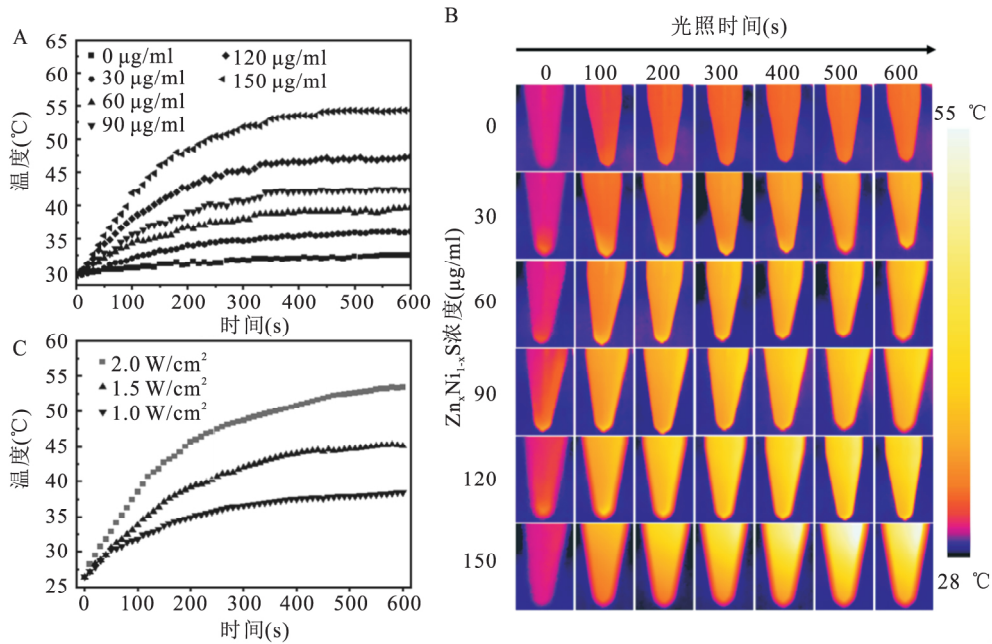


图4 Zn_xNi_{1-x}S 纳米结构的光热性能研究

A: 不同浓度的 Zn_xNi_{1-x}S 溶液在 NIR 光照射 (808 nm, 2 W/cm²) 下的温度; B: 对应的红外热成像图; C: 不同功率 NIR 光照射下 Zn_xNi_{1-x}S 溶液的温度

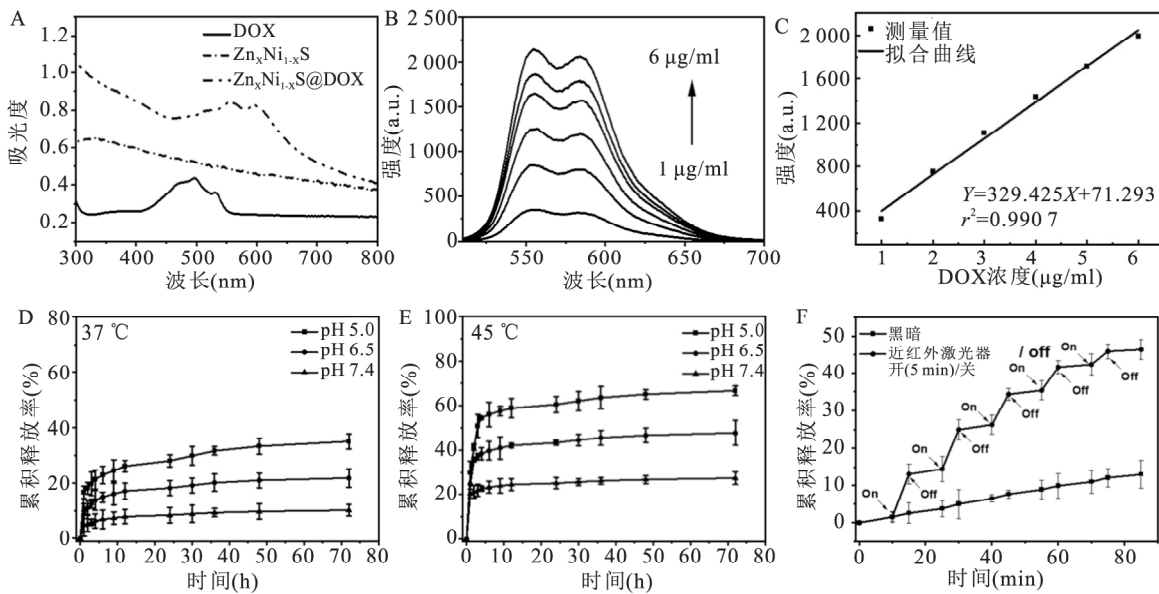


图5 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构的药物响应释放研究

A: 样品的紫外 - 可见吸收光谱; B: 不同浓度 DOX 的荧光光谱; C: 对应的标准曲线; D、E: 不同温度、pH 下 DOX 的释放曲线; F: NIR 光照射下 DOX 的释放曲线

通过细胞 MTT 实验评估了 Zn_xNi_{1-x}S 空心纳米结构的生物安全性。与对照组相比,实验组 HUVECs 细胞的存活率整体均高于 80%,见图 6,差异有统计学意义 ($F = 15.04, P < 0.001$)。这表明 Zn_xNi_{1-x}S 纳米粒子具有良好的生物安全性。

2.7 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 纳米结构的体外抗肿瘤效

果检测 当用 NIR 光照射时,随着 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 浓度的增加 A11 细胞存活率逐渐降低。当浓度为 100 µg/ml 时 A11 细胞存活率仅为 10% 左右,表明 Zn_xNi_{1-x}S@DOX 能有效杀伤肿瘤细胞。而同等条件下无 NIR 光照射时 A11 的存活率保持在 70% 附近,见图 7。同等浓度下,比较有无 NIR 光照射时的

细胞存活率, 差异有统计学意义 ($F = 46.126$ 、 222.194 、 168.406 、 494.395 、 989.943 , $P < 0.001$)。这表明持续的 NIR 光照射能够使治疗部位温度升高并促进 DOX 的释放, 将光热疗法与化学疗法相联合, 显著地提高体外抗肿瘤效果。

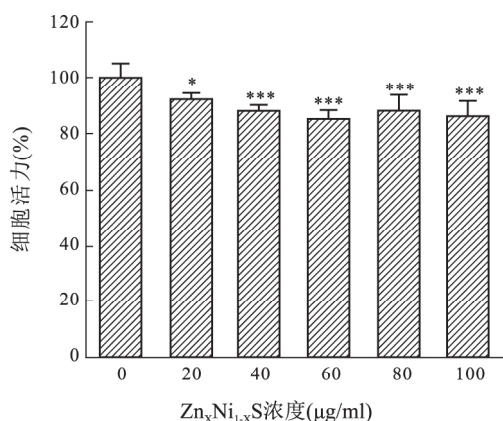


图6 不同浓度 $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米颗粒与 HUVECs 共同培养 24 h 细胞存活率与 0 $\mu\text{g/ml}$ 比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

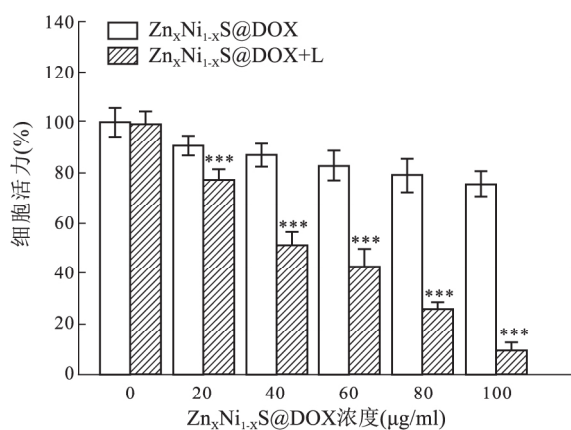


图7 不同浓度 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米颗粒与 4T1 细胞共同培养 24 h 细胞存活率与 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 组比较: *** $P < 0.001$

3 讨论

由于环境恶化及饮食习惯不健康等因素, 恶性肿瘤已成为严重威胁人类健康的重大疾病之一。手术切除、放疗等常规的治疗方法因其创伤较大、难以彻底清除病变组织、易于复发等局限性, 已经不能满足现实需求^[9]。近年来, 纳米科技的快速发展为肿瘤的治疗提供了新的选择, PTT 因其独特优势已成为肿瘤治疗领域研究的热点。在 NIR 光作用下, PTT 能够通过光热剂在近红外区的能量转换作用,

使肿瘤区域温度快速升高, 并诱导肿瘤细胞死亡^[10-11]。然而, 单一的 PTT 可能存在治疗不彻底、用药剂量大等局限性, 为了进一步提高抗肿瘤功效, 可将 PTT 与化学疗法联合, 构造能够进行光热-化学疗法联合治疗的纳米体系。

本研究使用溶剂热法成功合成了 $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米结构, 该纳米颗粒分散性良好且尺寸均一, 平均直径约为 300 nm。光热性能研究实验表明 $Zn_xNi_{1-x}S$ 溶液浓度为 0、30、60、90、120、150 $\mu\text{g/ml}$ 时, NIR 光持续照射 10 min 后, 温度分别升高至 32.5、36.0、39.6、42.3、47.1、53.5 $^{\circ}\text{C}$, 其光热效果具有明显的浓度依赖性。此外, 其光热性能还表现出功率依赖性, 当激光器功率为 1.0、1.5、2.0 W/cm^2 时, 温度分别为 28.98、45.10、53.50 $^{\circ}\text{C}$ 。以上表明所合成的 $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米结构是一种良好的光热纳米材料。生物相容性评估表明 $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米结构对正常细胞无明显毒性, 具有良好的生物安全性, 能够用于后续研究。基于 $Zn_xNi_{1-x}S$ 纳米颗粒中空结构的独特优势, 可将其作为载体, 构建药物递送体系, 使其负载 DOX 得到 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米结构。通过改变温度模拟光热升温, 调节介质 pH 值模拟肿瘤组织微酸性环境, 探究 DOX 的释放行为, 药物释放结果表明, 温度升高、pH 降低及 NIR 光照射都能显著提高 DOX 的释放速率。当介质 pH 为 5.0, 温度升高至 45 $^{\circ}\text{C}$ 时, $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米结构的药物的释放率可达到约 60%。此外, DOX 的释放行为还表现出 NIR 光响应性, 黑暗条件下释放率约为 13%, 在 NIR 激光器打开状态下, DOX 的释放速率约为 46%, 约为黑暗条件下的 3.5 倍, 这可能是因为在 808 nm 激光器的照射下, $Zn_xNi_{1-x}S$ 的光热效应使得溶液温度升高, 促进了 DOX 的释放。MTT 实验也证实在 NIR 光照射下 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米结构能够更加显著地杀伤肿瘤细胞, 当 $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, 无 NIR 光照射条件下 4T1 的存活率约为 70%, 而 NIR 光照射下 4T1 细胞存活率约为 10%, 表明该材料具有良好的抗肿瘤功效, 对于临床治疗具有重要意义。

综上所述, $Zn_xNi_{1-x}S@DOX$ 纳米结构能够有效的联合光热疗法和化学疗法, 对肿瘤细胞进行杀伤, 作为一种新型的抗肿瘤材料, 具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Lei Z Y, Zhang W L, Li B, et al. A full-spectrum-absorption from nickel sulphide nanoparticles for efficient NIR-II window photo-

- thermal therapy [J]. *Nanoscale*, 2019, 11(42): 20161–70.
- [2] Wang X W, Li F, Yan X, et al. Ambient aqueous synthesis of ultrasmall Ni_{0.85}Se nanoparticles for noninvasive photoacoustic imaging and combined photothermal-chemotherapy of cancer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(48): 41782–93.
- [3] Liu Y, Zhen W Y, Wang Y H, et al. Double switch biodegradable porous hollow trinickel monophosphide nanospheres for multimodal imaging guided photothermal therapy [J]. *Nano Lett*, 2019, 19(8): 5093–101.
- [4] Song Y, Qu Z, Li J B, et al. Fabrication of the biomimetic DOX/Au@Pt nanoparticles hybrid nanostructures for the combinational chemo/photothermal cancer therapy [J]. *J Alloy Compd*, 2021, 881: 160592.
- [5] Tian B S, Liu S K, Feng L L, et al. Renal-clearable nickel-doped carbon dots with boosted photothermal conversion efficiency for multimodal imaging-guided cancer therapy in the second near-infrared biowindow [J]. *Adv Funct Mater*, 2021, 31(26): 2100549.
- [6] Qian Y, Wang D M, Tian X F, et al. Synthesis of urchin-like nickel nanoparticles with enhanced rotating magnetic field-induced cell necrosis and tumor inhibition [J]. *Chem Eng J*, 2020, 400: 125823.
- [7] Ruan J, Liu H, Chen B J, et al. Interfacially engineered Zn_xMn_{1-x}S@polydopamine hollow nanospheres for glutathione depleting photothermally enhanced chemodynamic therapy [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(7): 11428–40.
- [8] Wang W N, Pei P, Chu Z Y, et al. Bi₂S₃ coated Au nanorods for enhanced photodynamic and photothermal antibacterial activities under NIR light [J]. *Chem Eng J*, 2020, 397: 125488.
- [9] 陈辉, 肖建敏, 许瑞, 等. 硅酸铜纳米颗粒作为化学动力学治疗剂的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(1): 1–6.
- [10] Wang Y F, Meng H M, Li Z H. Near-infrared inorganic nanomaterial-based nanosystems for photothermal therapy [J]. *Nanoscale*, 2021, 13(19): 8751–72.
- [11] Wang H Y, Chang J J, Shi M W, et al. A dual-targeted organic photothermal agent for enhanced photothermal therapy [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(4): 1057–61.

Zn_xNi_{1-x}S@DOX nanostructures for combined photothermal-chemotherapy of cancer

Jin Qianqian¹, Ma Xuke¹, Zhu Xuerui¹, Zha Zhengbao¹, Qian Haisheng²

(¹*School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009;*

²*School of Biomedical Engineering, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To explore the application of Zn_xNi_{1-x}S@DOX nanostructures in combined photothermal-chemotherapy treatment of tumors, and to provide new ideas for the study of tumor treatment methods. **Methods** The morphology and elementary composition of Zn_xNi_{1-x}S nanostructures were characterized by scanning emission electron microscopy and other methods. The photothermal properties of Zn_xNi_{1-x}S nanostructures were explored by infrared thermal camera. The release of DOX under different temperature and pH was investigated by fluorescence spectrophotometer. The biosafety of Zn_xNi_{1-x}S nanostructures and the *in vitro* antitumor properties of Zn_xNi_{1-x}S@DOX nanostructures were investigated by MTT assay. **Results** The as-prepared Zn_xNi_{1-x}S nanostructure had good dispersion and uniform size. The Zn_xNi_{1-x}S nanostructures had good photothermal effect. The drug release behavior showed temperature and pH responsiveness. The MTT assay showed that Zn_xNi_{1-x}S nanostructures were nontoxic to normal cells. Zn_xNi_{1-x}S@DOX nanostructures could significantly inhibit the growth of tumor cells under near-infrared illumination. **Conclusion** The as-prepared Zn_xNi_{1-x}S nanostructure has good biocompatibility, on the basis of which the Zn_xNi_{1-x}S@DOX nanostructures achieve good antitumor performance, which can be used for combined photothermal-chemotherapy treatment of tumors.

Key words Zn_xNi_{1-x}S@DOX nanostructures; photothermal therapy; antitumor; combined therapy