

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.03.003

· 基础研究 ·

## 负载 BMSC 来源纳米囊泡的硒化透明质酸水凝胶的制备及其对胶质瘤 GL261 细胞的杀伤作用

张转转<sup>1,2,Δ</sup>, 周旋<sup>2,3,Δ</sup>, 陈翠敏<sup>2,4</sup>, 张停琳<sup>2,4</sup>, 高洁<sup>2,4</sup> (1. 上海大学 转化医学研究院, 上海 200444; 2. 海军军医大学 第一附属医院 临床研究中心, 上海 200433; 3. 河南大学 药学院, 河南 郑州 475004; 4. 海军军医大学 第一附属医院 上海市航海医学与药械转化重点实验室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 构建纳米囊泡杂化透明质酸水凝胶(ICG-NV@SeHA)并探讨其联合声动力疗法(SDT)杀伤小鼠胶质瘤 GL261 细胞的机制。**方法:** 通过挤出法制备骨髓来源的间充质干细胞纳米囊泡(BMSC-NV), 再将吲哚菁绿(ICG)掺入其中制备 ICG-NV。在 EDC 存在下用 ED 对 HA 进行氨基化, 合成 AHA, 进一步通过亲核加成反应与  $\gamma$ -硒代丁内酯(SBL)连接, 合成 SeHA。将 AHA、ICG-NV 和 SBL 溶液混合, 发生氧化交联获得 ICG-NV@SeHA, 对其进行物理表征。用 DiD 标记 ICG-NV 和 ICG-NV@SeHA 后与 GL261 细胞共培养 12 h, 观察细胞内吞情况。用 CCK-8 法检测 ICG-NV 和 ICG-NV@SeHA 与 GL261 细胞和小鼠海马神经元 HT22 细胞的生物相容性。将 GL261 细胞分为 PBS+超声处理(US)、ICG+US、IVG-NV+US 和 ICG-NV@SeHA+US 组, Calcein-AM/PI 染色法和 DCFH-DA 荧光探针标记法分别检测联合 SDT 对 GL261 细胞杀伤作用, 以及对细胞内活性氧(ROS)生成的影响; 采用细胞免疫荧光实验检测对细胞表面钙网蛋白(CRT)表达的影响, 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测对细胞高迁移率族蛋白 1(HMGB1)和三磷酸腺苷(ATP)释放的影响。**结果:** 成功制备 BMSC-NV, 粒径约 154.3 nm; ICG 成功被包入囊泡中, 包封率为 40.6%; 氨基成功连接在 HA 上, 接枝率为 32.5%。最后成功制备了 ICG-NV@SeHA, 透射电镜观察显示其具有疏松的多孔结构, 流变结果储能模量( $G'$ ) > 损耗模量( $G''$ ), 均符合水凝胶特性, 且具有剪切变稀特性。细胞实验结果显示, ICG-NV 可以被 GL261 细胞有效摄取。CCK-8 实验和 Calcein-AM/PI 荧光染色实验结果显示, ICG-NV 和 ICG-NV@SeHA 均具有良好的生物相容性, 对 GL261 和 HT22 细胞没有明显的细胞毒作用; 而 ICG-NV+US 和 ICG-NV@SeHA+US 组细胞存活率较 ICG+US 组显著降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。ICG-NV+US 和 ICG-NV@SeHA+US 组细胞 DCFH-DA 探针绿色荧光强度显著高于 PBS、PBS+US 和 ICG+US 组( $P < 0.0001$  或  $P < 0.001$ ), 反映细胞内产生大量的 ROS, 且细胞表面 CRT 表达显著增加( $P < 0.0001$ ), 上清液中 HMGB1 和 ATP 的释放也增多( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:** 成功制备具备优异的机械性能和可注射性的 ICG-NV@SeHA, 生物相容性好, 联合 SDT 能有效杀伤 GL261 细胞并诱导免疫原性细胞死亡(ICD), 可能成为一种有效治疗胶质瘤术后复发的新手段。

**[关键词]** 胶质瘤; 纳米囊泡; GL261 细胞; 声动力疗法; 吲哚菁绿; 复合水凝胶

**[中图分类号]** R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)03-0247-10

## Preparation of selenized hyaluronic acid hydrogel loaded with BMSC-derived nanovesicles and investigation of its cytotoxic effect on glioma GL261 cells

ZHANG Zhuanzhuan<sup>1,2,Δ</sup>, ZHOU Xuan<sup>2,3,Δ</sup>, CHEN Cuimin<sup>2,4</sup>, ZHANG Tinglin<sup>2,4</sup>, GAO Jie<sup>2,4</sup> (1. Institute of Translational Medicine, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Clinical Research Unit, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 3. College of Pharmacy, Henan University, Zhengzhou 475004, Henan, China; 4. Key Laboratory of Marine Medicine and Drug Transformation, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract] Objective:** The nanovesicles-hybridized selenized hyaluronic acid hydrogel (ICG-NV@SeHA) was constructed, and its mechanism of action in synergistically killing glioma GL261 cells in mice when combined with sonodynamic therapy (SDT) was systematically investigated. **Methods:** BMSC-derived nanovesicles (BMSC-NVs) were prepared *via* the extrusion method, followed by the incorporation of indocyanine green (ICG) to fabricate ICG-NV. Under the presence of EDC, hyaluronic acid (HA) was aminated using ethylenediamine (ED) to synthesize aminated HA (AHA), which was further conjugated with  $\gamma$ -selenobutyrolactone (SBL) *via*

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 82072051)

**[作者简介]** 张转转(1999—), 女, 硕士生, 主要从事抗癌修复仿生智能纳米材料的研究, E-mail: zhuan\_1231@163.com; 周旋(1997—), 男, 硕士生, 主要从事抗癌修复仿生智能纳米材料的研究, E-mail: 80324524@qq.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

nucleophilic addition to form selenized HA (SeHA). AHA, ICG-NVs, and SBL solutions were mixed and oxidatively cross-linked to obtain ICG-NV@SeHA, followed by physical characterization. DiD-labeled ICG-NVs and ICG-NV@SeHA were co-cultured with GL261 cells for 12 h to observe cellular internalization. The biocompatibility of ICG-NVs and ICG-NV@SeHA with GL261 cells and mouse hippocampal neuronal HT22 cells was evaluated using the CCK-8 assay. GL261 cells were divided into four groups: PBS + ultrasound (US), ICG + US, ICG-NV + US, and ICG-NV@SeHA + US. Calcein-AM/PI staining and DCFH-DA fluorescent probes were employed to assess the synergistic SDT-induced cytotoxic effects on GL261 cells and intracellular reactive oxygen (ROS) generation, respectively. Cellular surface calreticulin (CRT) expression was analyzed *via* immunofluorescence, while enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the release of high mobility group box 1 (HMGB1) and adenosine triphosphate (ATP). **Results:** BMSC-NVs were successfully prepared with an average particle size of approximately 154.3 nm. ICG was efficiently encapsulated into the nanovesicles with an encapsulation efficiency of 40.6%. HA was successfully aminated, achieving a grafting rate of 32.5%. Ultimately, the ICG-NV@SeHA hydrogel was successfully synthesized. Transmission electron microscopy (TEM) revealed a loose porous structure, and rheological analysis demonstrated that the storage modulus ( $G'$ ) exceeded the loss modulus ( $G''$ ), consistent with hydrogel characteristics, along with shear-thinning behavior. Cellular experiments showed that ICG-NVs were effectively internalized by GL261 glioma cells. CCK-8 assays and Calcein-AM/PI fluorescence staining confirmed that both ICG-NVs and ICG-NV@SeHA exhibited excellent biocompatibility with no significant cytotoxicity toward GL261 and HT22 cells. However, the cell viability in the ICG-NV + US and ICG-NV@SeHA + US groups was significantly reduced compared to the ICG + US group ( $P < 0.01$  or  $P < 0.001$ ). DCFH-DA fluorescent probe assays revealed that the green fluorescence intensity in the ICG-NV + US and ICG-NV@SeHA + US groups was markedly higher than in the PBS, PBS + US, and ICG + US groups ( $P < 0.0001$  or  $P < 0.001$ ), reflecting substantial intracellular ROS production. Additionally, cell surface CRT expression was significantly upregulated ( $P < 0.0001$ ), and the release of HMGB1 and ATP in the supernatant increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The ICG-NV@SeHA hydrogel, which exhibits excellent mechanical properties and injectability, was successfully fabricated. Demonstrating favorable biocompatibility, this hydrogel, when combined with SDT, effectively kills glioma GL261 cells and induces immunogenic cell death (ICD). This strategy holds potential as a novel approach to prevent postoperative recurrence in glioma treatment.

**[Key words]** glioma; nanovesicle; GL261 cell; sonodynamic therapy (SDT); indocyanine green (ICG); composite hydrogel

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(3): 247-256. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.03.003]

多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 是最常见的恶性原发性脑肿瘤<sup>[1-2]</sup>。GBM 的标准治疗是在最大程度切除肿瘤后进行放疗联合辅助化疗<sup>[3]</sup>。目前, GBM 治疗仍面临一些问题, 例如 GBM 的预后很差, 中位生存时间少于 15 个月<sup>[4]</sup>。除此之外, 手术切除造成一定体积的不规则空腔, 从而带来一系列的并发症, 引起神经功能受损等等<sup>[5]</sup>。因此, 临床亟待开发一种生物医用材料, 预防和治疗 GBM 术后复发引起的并发症。骨髓来源的间充质干细胞纳米囊泡 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell nanovesicle, BMSC-NV) 具有向肿瘤组织迁移的能力, 展现出靶向和归巢至肿瘤组织的天然倾向<sup>[6-7]</sup>。声动力疗法 (sonodynamic therapy, SDT) 是一种新型的超声治疗方式, 其中声敏剂被用来产生单线态氧以杀死肿瘤细胞<sup>[8]</sup>。吖啶菁绿 (indocyanine green, ICG) 是一种成熟的声敏剂, 其在超声作用下能产生活性氧 (reactive oxygen, ROS), 具有肿瘤杀伤效应<sup>[9]</sup>。近年来, 研究<sup>[10-11]</sup>发现 SDT 可以诱导肿瘤细胞发生免疫原性细胞死亡 (immunogenic cell death, ICD), 最终触发强烈的抗肿瘤免疫反应。水凝胶是由高分子聚合物形成的亲水性三维空间网状结构, 利用水凝胶延长药物的释放和提高纳米载体的稳定性, 已被广泛研究<sup>[12-13]</sup>。透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是细胞

外基质 (extracellular matrix, ECM) 的关键成分, 被广泛用于水凝胶给药系统<sup>[14]</sup>。本研究通过合理设计, 将 ICG 掺杂在 BMSC-NV 后与硒化物连接氨基化透明质酸 (aminidylated hyaluronic acid, AHA) 进行反应, 最终制备成功能化的水凝胶系统, 命名为 ICG-NV@SeHA, 并初步探究其对小鼠胶质瘤 GL261 细胞的杀伤能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、主要试剂及仪器

BMSC、小鼠胶质瘤细胞 GL261、小鼠海马神经元细胞 HT22 均购自上海葵赛生物科技有限公司。ICG (货号: BD134593, 纯度  $\geq 98\%$ ) 购自上海毕得医药科技有限公司, 盐酸乙二胺 (ethylenediamine dihydrochloride, ED; 货号: E808944, 纯度  $\geq 99\%$ )、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC; 货号: N808856, 纯度  $\geq 98\%$ )、冰醋酸 (acetic acid, Ac; 货号: A801295, 纯度  $\geq 99\%$ ) 均购自麦克林上海麦克林生化科技有限公司, 透明质酸钠 (货号: S12034, 分子量  $1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ , USP 级) 购自上海源叶生物科技有限公司,  $\gamma$ -硒代丁内酯 (SBL, 纯度  $\geq 95\%$ ) 由苏州大学实验室合成, BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: P0009)、CCK-8 细胞增殖检测试剂盒 (货号:

C0038)、细胞膜远红外探针 DiD(货号:C1039)、ATP 酶联免疫吸附测定试剂盒(货号:S0026)均购自上海碧云天生物科技有限公司,Calcein-AM/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒(货号:E-CK-A354)、HMGB1 酶联免疫吸附实验(ELISA)测定试剂盒(货号:E-EL-M0676c)均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,活性氧(ROS)测定试剂盒(货号:E004-1-1)购自南京建成公司,钙网蛋白(calreticulin, CRT)抗体(货号:27298-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司, Cy3 标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(货号:GB21303) 购自武汉赛维尔生物技术有限公司。610000-1EA 型薄膜挤出器购自美国 Avanti 公司,马尔文粒径仪购自英国 Malvern 公司,紫外可见分光光度计、Fisher Multiskan FC 酶标仪、X 射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)均购自赛默飞世尔科技公司, FEI Tecnai F20 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)、GeminiSEM 300 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)均购自德国蔡司公司,600 MHz 磁共振波谱仪购自德国 Bruker 公司,倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司,超声治疗仪购自美国 Chattanooga 公司。

## 1.2 细胞培养

小鼠胶质瘤细胞 GL261、神经细胞 HT22 用高糖 DMEM 培养液, BMSC 用  $\alpha$ -MEM 培养液,均置于 CO<sub>2</sub> 体积分数为 5%、湿度 70% 的培养箱中培养,培养液中均含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1% 青霉素和 1% 链霉素,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化和传代。

## 1.3 ICG-NV@SeHA 的制备

### 1.3.1 ICG-NV 的制备

#### 1.3.1.1 机械挤出法制备 BMSC-NV

BMSC 细胞培养于 CO<sub>2</sub> 体积分数为 5% 培养箱内,待细胞汇合度达 90% 时,消化并收集细胞于 15 mL 离心管内,235 × g 离心 5 min,弃上清液。使用 PBS 重新悬浮细胞,并调整细胞为 2 × 10<sup>6</sup> 个/mL,使用薄膜挤出器依次在 5、1、0.4 和 0.2  $\mu$ m 聚碳酸酯膜下反复挤压细胞悬浮液 20 次。最终挤压样品在 4 °C、10 000 × g 条件下离心 10 min,取上清液备用。

#### 1.3.1.2 ICG-NV 的制备

将 1 mg BMSC-NV 加入到 1 mL ICG 溶液(1 mg/mL)中,在黑暗、4 °C 条件下搅拌温育 2 h,制备 ICG-NV。使用 100 kDa 超滤管去除未包被的 ICG。

### 1.3.2 AHA 的制备

参考文献[15]的制备方法,将 947.5 mg 的 HA 溶于 100 mL 超纯水中,室温搅拌至完全溶解,缓慢滴加 10%

Ac 溶液至 pH 值约为 5,再加入 4.988 g ED,继续用 Ac 将 pH 调回 5,然后加入 776.2 mg EDC,在室温下反应过夜。将反应混合物在超纯水中透析 3 d(透析袋截留分子量为 3 500),去除多余的 ED 和 EDC,冻干后得到 AHA,最后用核磁共振氢谱检测其接枝率。

### 1.3.3 ICG-NV@SeHA 的合成

称取 20 mg 冻干后的 AHA 至超纯水中,得到质量浓度为 20 mg/mL 的溶液;将 AHA 溶液, ICG-NV 溶液、SBL 溶液按照一定的体积比混合均匀, ICG-NV 的最终质量浓度为 0.1 mg/mL;将溶液置于空气中,氧化交联以制备 ICG-NV@SeHA。

## 1.4 ICG-NV@SeHA 的表征

### 1.4.1 BMSC-NV 和 ICG-NV 的表征

将 BMSC-NV 和 ICG-NV 稀释至 1 mg/mL,之后使用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)检测,并在 TEM 下观察,鉴定其形态。取样品滴于铜网上,室温静置 2 min 并吸干多余液体,在网上滴加 20 mg/mL 醋酸铀溶液进行负染,吸干多余液体,晾干含细胞外囊泡的铜网。紫外分光光度法测定包封率:紫外分光光度计检测 BMSC-NV、ICG-NV 溶液在 200~1 000 nm 波长范围内的紫外吸收。然后测定 ICG 在 790 nm 处的吸光度值,绘制出 ICG 的吸光度-浓度值的标准曲线,最后测定 790 nm 处 ICG-NV 处的吸光度值,根据标准曲线计算 ICG-NV 中的 ICG 浓度,计算其包封率。

### 1.4.2 检测 AHA 接枝率

分别取少量的 HA 和 AHA,用氘代水充分溶解,然后将样品转移至核磁管中。通过 Bruker 600 MHz 核磁测试仪检测。

### 1.4.3 ICG-NV@SeHA 的表征

采用 XPS 测定 AHA 和 SeHA 水凝胶中的元素;采用斜置瓶法观察样品状态,研究凝胶性;采用 SEM 观察微观形貌;采用流变仪测试储能模量 G' 和损耗模量 G'' 以及剪切变稀特性。

## 1.5 DiD 染色法观察 GL261 细胞对 ICG-NV 的内吞

使用远红外探针 DiD 标记:DiD 与 ICG-NV 或 ICG-NV@SeHA 在 25 °C 下反应 30 min,超滤、离心以去除游离的 DiD,最终得到 DiD 修饰的 ICG-NV 和 ICG-NV@SeHA。随后,将 DiD 标记的 ICG-NV、ICG-NV@SeHA 与 GL261 细胞混合后反应 12 h,用 PBS 洗涤细胞后,常温下用 4% 多聚甲醛固定 20 min,最后用 DAPI 染色 20 min, PBS 洗涤细胞后,使用倒置显微镜观察 ICG-NV 和 ICG-NV@SeHA 中 ICG-NV 被 GL261 细胞内吞的情况。

1.6 CCK-8 法检测材料对 GL261、HT22 细胞的毒性  
将 GL261、HT22 细胞按 1 × 10<sup>4</sup> 个/孔接种至 96 孔板,

培养12 h后分为PBS、ICG、IVG-NV和ICG-NV@SeHA溶液组,分别加入PBS、0.1 mg/mL的ICG、0.1 mg/mL的IVG-NV和20 mg/mL的ICG-NV@SeHA,在细胞培养箱中温育24 h后,采用CCK-8试剂盒检测细胞活力。

### 1.7 CCK-8法检测材料联合超声处理对GL261细胞活力的影响

GL261细胞分组处理同1.6节,在细胞培养箱中温育24 h后,对细胞进行超声处理( $1.0 \text{ W/cm}^2$ )5 min(占空比为20%),分组命名为PBS + US、ICG + US、IVG-NV + US和ICG-NV@SeHA + US。继续培养12 h,采用CCK-8试剂盒检测细胞活力。

### 1.8 Calcein-AM/PI染色法检测材料对GL261细胞的杀伤能力

将GL261细胞按1.7节所述方法进行分组处理,之后进行Calcein-AM/PI染色,37 °C反应30 min,温育结束后,在荧光显微镜下观察、拍摄照片,用Image J软件对荧光强度进行定量分析。

### 1.9 DCFH-DA荧光探针检测材料对GL261细胞ROS生成能力的影响

将GL261细胞按1.7节所述方法进行分组处理,弃去旧培养液后加入含有DCFH-DA荧光探针( $10 \mu\text{mol/L}$ )的新鲜培养液,温育30 min,随后进行或不进行超声处理(方法同1.7节),温育6 h后在荧光显微镜下观察、拍摄照片,用Image J软件对荧光强度进行定量分析。

### 1.10 检测SDT的ICD诱导能力

将GL261细胞按1.7节所述方法进行分组处理,离心、分离细胞和培养上清液。细胞经PBS洗涤后用4%多聚甲醛固定30 min,羊血清封闭30 min,加入CRT一抗在4 °C下温育12 h,洗涤后,细胞在室温下与Cy3标记的二抗温育30 min。用DAPI染液进行核染色20 min,荧光显微镜下观察、拍照,用Image J软件对荧光进行定量分析。培养上清液则用ELISA分别检测HMGB1和ATP的释放。所有的步骤均按照试剂盒的说明书进行。

### 1.11 统计学处理

采用Origin 2022、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资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较采用单因素方差分析,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 BMSC-NV成功包被ICG制得ICG-NV

透射电镜检测结果显示,BMSC-NV粒径为100~150 nm(图1A),形状呈近似球形;包被ICG后,形状仍呈球形并具备完整的膜结构(图1B),说明ICG的加入不会改变囊泡结构。DLS检测结果显示,BMSC-NV纳米载体的水合粒径为154.3 nm,包被ICG后粒径增加至187.9 nm,初步证明ICG包被成功。另外,紫外可见光光谱法分析结果(图1C)显示,ICG-NV的吸收光谱在790 nm处表现出明显的特征峰,进一步证实ICG成功掺入BMSC-NV中。通过定量测定ICG在790 nm处的吸光度值,根据标准曲线(图1D)计算ICG-NV中的ICG含量,最终测得囊泡的包封率为40.6%。

### 2.2 SeHA的合成与表征

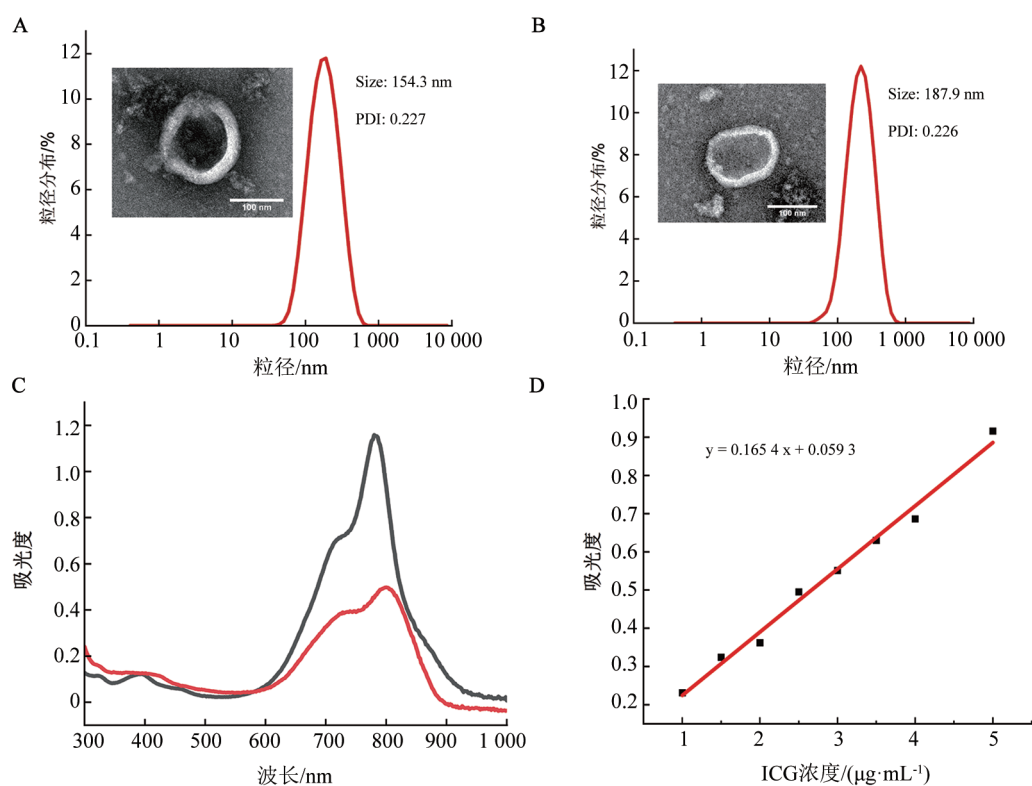
在EDC存在下用ED对HA进行改性(图2A),以引入额外的氨基以获得AHA。1H-NMR分析证实了AHA的成功合成(图2C)。AHA的核磁谱中出现了与-CH<sub>2</sub>标记的氨基符合的质子峰。相对应的信号约为 $2.89 \times 10^6$ ,计算出的-CH<sub>2</sub>标记的氨基的质子转化率约为32.5%。通过亲核加成反应将AHA与SBL连接,合成SeHA(图2B)。为了证实开环反应的发生,通过XPS分析了HA和SeHA元素含量(图2D),分别在285、399、533和56 eV附近观察到结合能为C 1s、N 1s、O 1s和Se 3d的C、N、O和Se元素。根据先前报道<sup>[16-17]</sup>,可以确认AHA被SBL成功修饰。以上结果表明,SeHA制备成功。

### 2.3 ICG-NV@SeHA的表征

采用斜置瓶法观察ICG-NV@SeHA的形态,3种溶液在加入SBL后,均成功转变为凝胶状态(图3A)。进一步通过SEM观察水凝胶的内部结构(图3B)发现,SeHA水凝胶呈现疏松多孔结构,而ICG-NV的加入并未改变其内部结构。用流变仪检测水凝胶的弹性模量,结果(图3C)显示,ICG-NV@SeHA的储能模量( $G'$ )均大于损耗模量( $G''$ ),说明水凝胶主要发生弹性形变,呈现出类固态特征。水凝胶的弹性模量在中枢神经系统的弹性模量范围内(30~3 000 Pa),适合作为神经支架<sup>[18]</sup>。在本研究中,水凝胶在1~10 Hz的频率范围内表现出良好的稳定性和剪切变稀特性(图3D),表明水凝胶具有较好的可注射性。

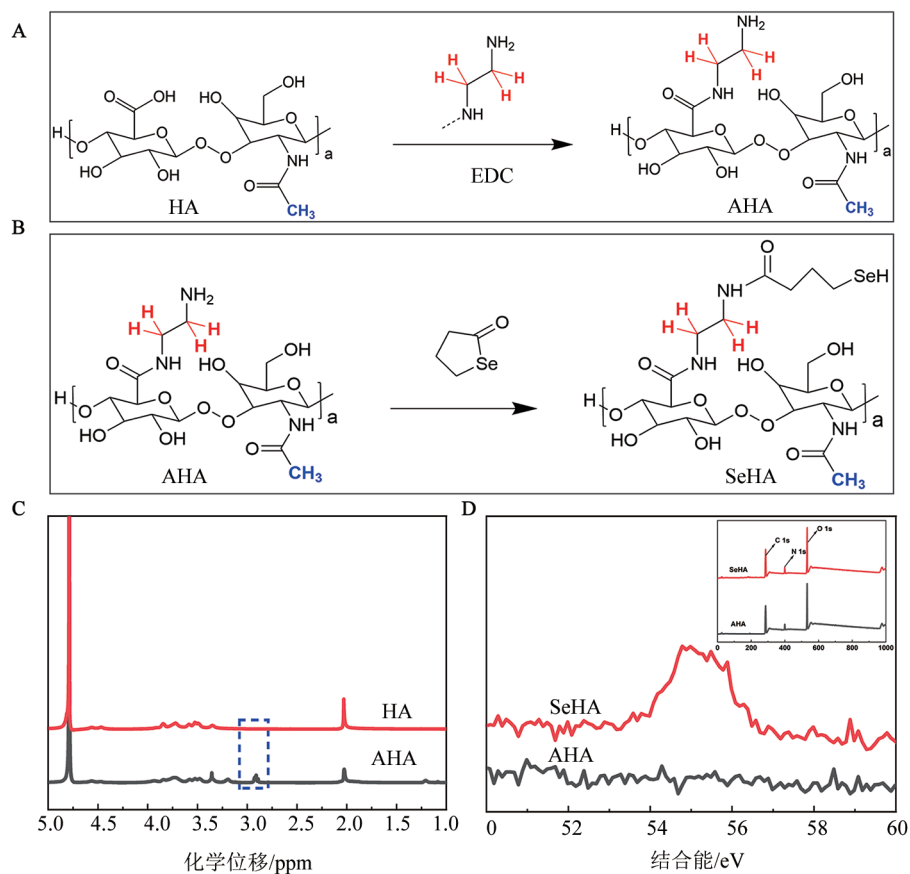
### 2.4 ICG-NV能够被GL261细胞有效内吞

ICG-NV和ICG-NV@SeHA与GL261细胞共培养12 h后,倒置显微镜下观察发现(图4),ICG-NV和ICG-NV@SeHA中的ICG-NV被GL261细胞成功内吞,并且在细胞核周围形成了明显的环绕分布。这一观察结果表明,囊泡能够有效地被细胞摄取。



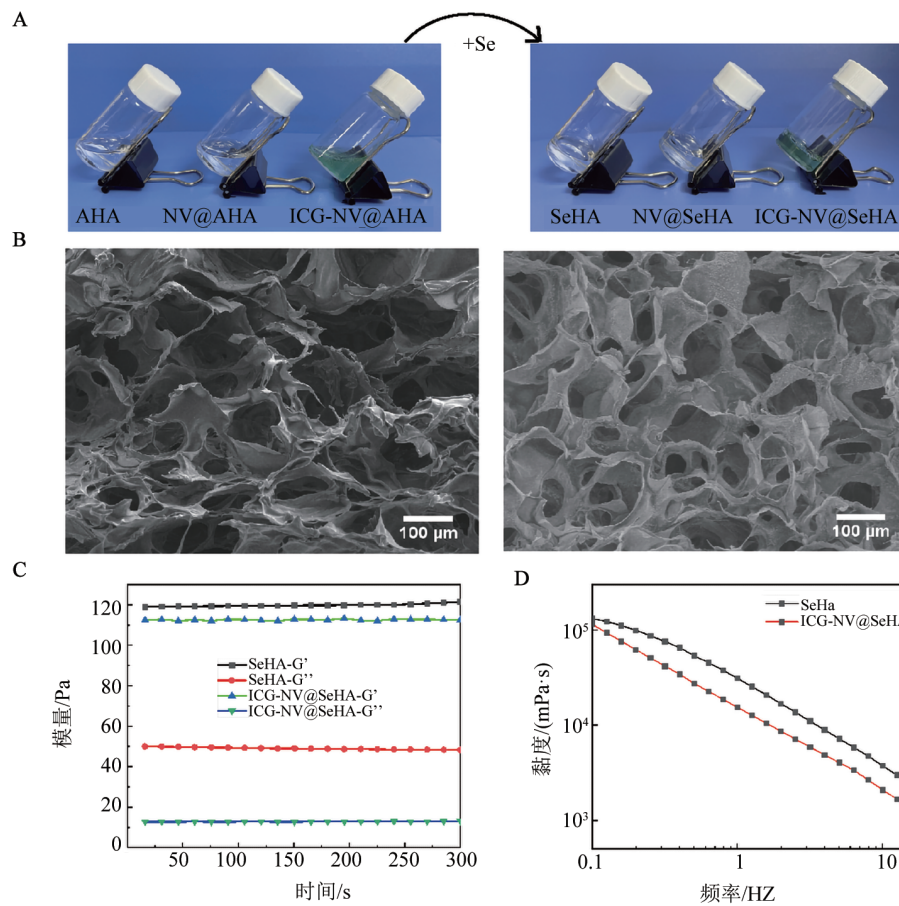
A: BMSC-NV 粒径分布与 TEM 观察图像; B: ICG-NV 粒径分布与 TEM 观察图像(标尺: 100 nm); C: BMSC-NV 与 ICG-NV 的紫外吸收光谱图; D: ICG 的紫外吸收标准曲线。

图1 BMSC-NV 和 ICG-NV 的表征



A: AHA 的合成示意图; B: SeHA 的合成示意图; C: HA 与 AHA 的  $^1\text{H}$  NMR 谱图; D: AHA 和 SeHA 的 XPS 图谱。

图2 SeHA 的合成与表征



A: 水凝胶形成前后的宏观形貌图像; B、C: SeHA 和 ICG-NV@SeHA 的 SEM 图像(标尺: 100  $\mu\text{m}$ ); C: SeHA 和 ICG-NV@SeHA 的流变曲线; D: SeHA 和 ICG-NV@SeHA 剪切变稀曲线。

图3 ICG-NV@SeHA 的表征

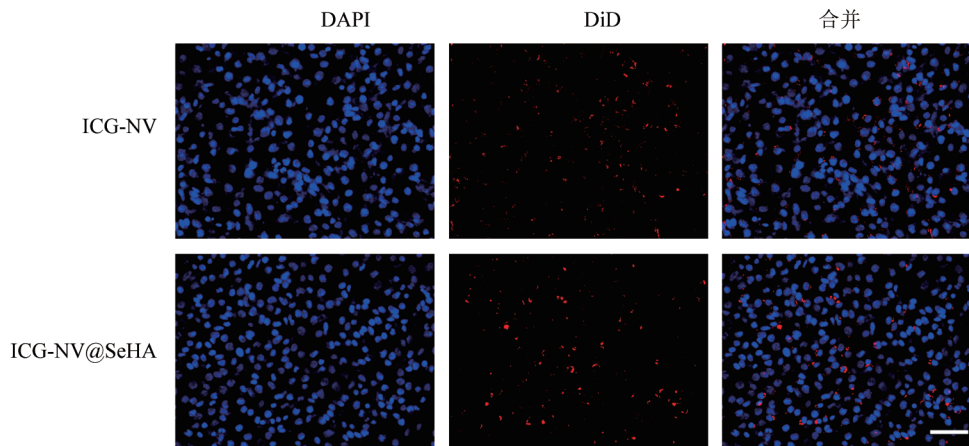


图4 倒置显微镜观察 ICG-NV 被 GL261 细胞内吞的荧光图像(标尺: 100  $\mu\text{m}$ )

### 2.5 ICG-NV@SeHA 对 GL261、HT22 细胞没有明显的细胞毒性

CCK-8 实验检测结果(图5)显示,在 0.1 mg/mL ICG、0.1 mg/mL ICG-NV 和 20 mg/mL 的 ICG-NV@SeHA 的处理 24 h 后, GL261、HT22 细胞存活率均与 PBS 组无显著差异。说明合成的各组材料具有良好的生物相容性。

### 2.6 ICG-NV@SeHA 联合超声处理能够产生与 ICG-NV 相似的 GL261 细胞杀伤作用

CCK-8 实验检测结果显示(图6),与 PBS 组相比, PBS+US 组 GL261 细胞活力没有明显变化,这表明所使用的超声照射的功率和时间 ( $1.0 \text{ W/cm}^2$ , 5 min) 不会对细胞造成明显损伤; ICG + US 组 GL261 细胞较 PBS 和 PBS + US 组显示出明显的细胞损伤 (均  $P < 0.001$ )。而 ICG-NV + US、ICG-NV@SeHA + US 组细胞存活率均显著低于 ICG + US 组 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。Calcein-AM/PI 染色法进一步评估不同

的材料在有无超声照射下对体外细胞的杀伤效果, 结果(图7A)显示, PBS和PBS + US组几乎没有观察到死细胞, ICG + US组可观察到一部分死细胞, 而 ICG-NV+US 和 ICG-NV@SeHA + US 组细胞几乎全部死亡; 定量分析结果(图7B)显示, ICG-NV + US 和 ICG-NV@SeHA + US 组的细胞死亡率近 100%, ICG + US 组仅约  $(21.52 \pm 5.09)\%$  ( $P < 0.0001$ )。以上结果表明, ICG、ICG-NV 以及水凝胶介导的 SDT 有显著的杀死肿瘤细胞的能力, 且 ICG-NV 和 ICG-NV@SeHA 介导的 SDT 效果优于单纯的 ICG。

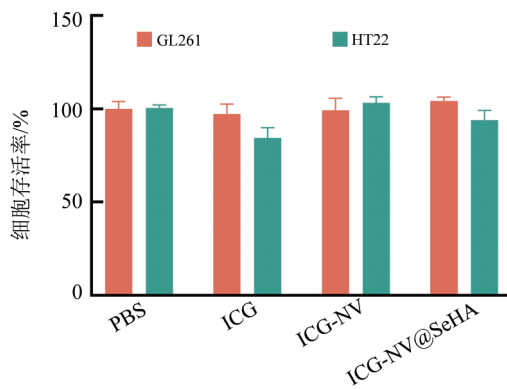
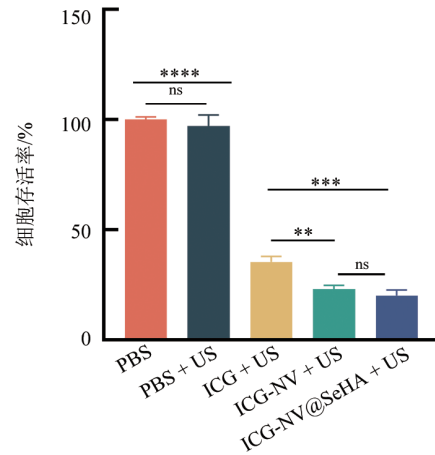


图5 不同材料对GL261、HT22细胞活力的影响

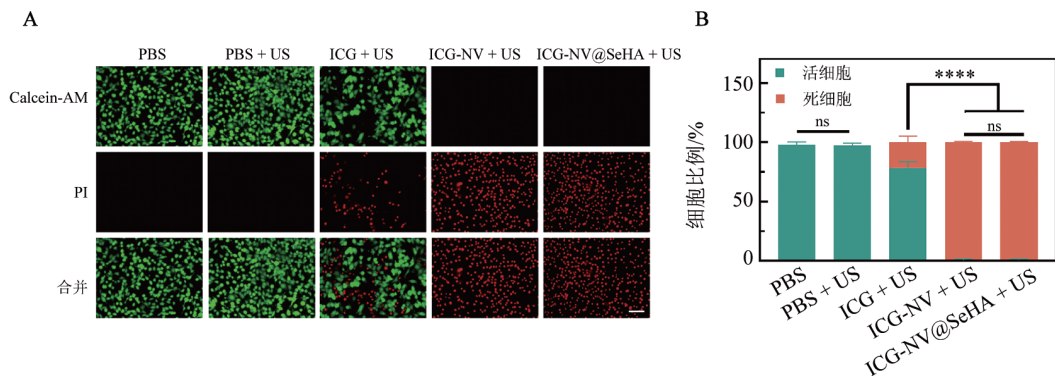
### 2.7 ICG-NV 与 ICG-NV@SeHA 联合超声处理促进 GL261 细胞产生 ROS

采用 DCFH-DA 荧光探针来检测超声照射下细胞内 ROS 的产生, 结果(图8)显示, 在用 PBS 处理的 GL261 细胞中, 无论有超声处理, 均未发现明显的荧光信号; 而在 ICG-NV + US 或 ICG-NV@SeHA + US 组细胞中观察到强烈的绿色荧光信号, 荧光强度显著高于 ICG + US 组 ( $P < 0.001$ ), 说明细胞内产生了大量的 ROS。



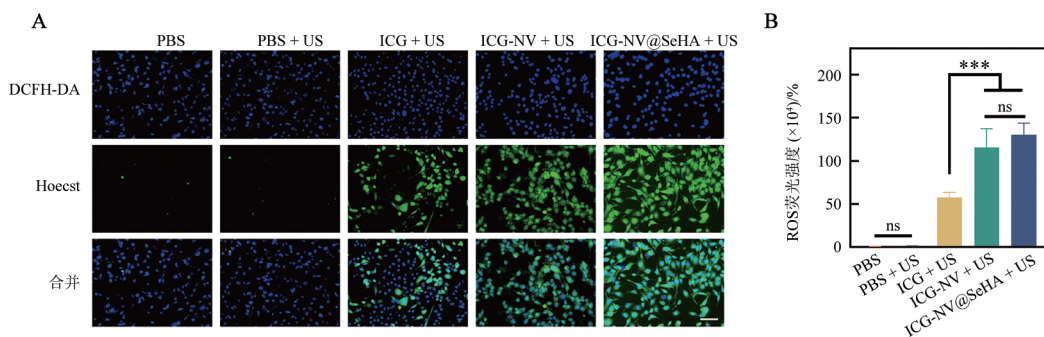
\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns: $P > 0.05$ 。

图6 不同材料联合超声处理对GL261细胞活力的影响



\*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns: $P > 0.05$ 。

图7 Calcein-AM/PI 荧光双染色法检测不同材料联合超声处理对GL261细胞的杀伤作用(标尺: 100 μm)



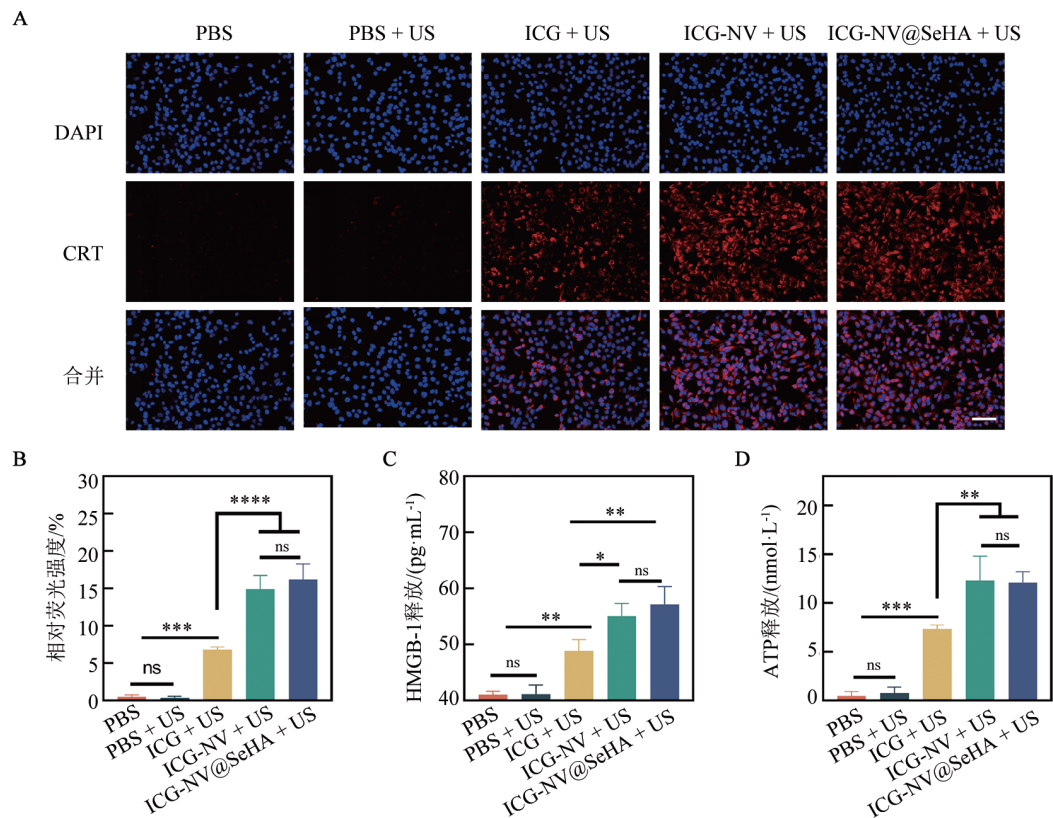
\*\*\* $P < 0.001$ ; ns: $P > 0.05$ 。

图8 GL261 细胞经不同处理后产生 ROS 的荧光图片(A, 标尺: 100 μm)和荧光信号的定量分析(B)

### 2.8 SDT的ICD诱导能力

CRT暴露作为ICD的一个显著特征,它可以向抗原提呈细胞发送“吃我”信号以激活抗肿瘤免疫反应<sup>[19-20]</sup>。荧光显微镜下观察结果(图9A、B)显示, ICG + US组GL261细胞较PBS和PBS + US组显示出一定的CRT暴露,这表明产生的ROS诱导了ICD效应(均 $P < 0.001$ ); ICG-NV + US和ICG-NV@SeHA + US组细胞表面CRT暴露水平则显著高于ICG + US组(均 $P < 0.0001$ )。ELISA检测结果显示,与

PBS和PBS + US组相比, ICG + US组培养上清液中HMGB-1 ( $P < 0.01$ )和ATP ( $P < 0.001$ )水平有所增加, ICG-NV + US和ICG-NV@SeHA组的HMGB-1水平则分别提高至ICG + US组的1.23倍( $P < 0.05$ )和1.47倍( $P < 0.01$ ,图9C), ATP浓度则分别提高至1.68倍( $P < 0.01$ )和1.65倍( $P < 0.01$ ,图9D)。上述结果证实, ICG介导的SDT能够触发ICD,封装在囊泡和水凝胶中的ICG能诱发更强烈的效果,且ICG-NV@SeHA诱导ICD的能力与ICG-NV相似。



A、B:经不同处理后GL261细胞表面的CRT表达的荧光图像和定量分析(标尺: 100 μm);

C、D:经不同处理后GL261细胞释放的HMGB1和ATP的定量分析。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns: $P > 0.05$ 。

图9 SDT的ICD诱导能力

### 3 讨论

治疗GBM是临床上的巨大挑战,患者预后不佳、复发率高,且病死数呈逐年上升趋势<sup>[21]</sup>。GBM固有的复发倾向以及手术切除、化疗和放疗可能造成的严重不良反应是无法忽视的问题。因此,开发一种高效且精准的非侵入性治疗方法变得尤为迫切<sup>[22-23]</sup>。SDT具有无创、高效、靶向性强等特点,是治疗GBM的一种有前景的方法。传统治疗方法可以通过诱导肿瘤细胞的ICD来改善肿瘤的免疫原性<sup>[24]</sup>。SDT同样能够有效诱导ICD,进而募集和激活免疫细胞,最终激活和增强机体抗肿瘤免疫应答<sup>[11, 25]</sup>。因此,将ICD诱导与SDT相结合,是治疗GBM的一个

充满希望的策略。

SDT的治疗效果在很大程度上取决于声敏剂的有效性,然而大多数有机声敏剂是疏水性的,在某些生理环境下经常会发生蓄积而导致疗效不佳。纳米载体可以促进声敏剂的细胞内递送,并通过增强的渗透性和保留效应优先将声敏剂转运到肿瘤区域<sup>[26-27]</sup>。外泌体是由细胞产生的纳米级(30~150 nm)膜囊泡,它们的内源性来源赋予了出色的生物相容性、较长的血液循环半衰期,并且免疫原性很小<sup>[28]</sup>。因此,外泌体被认为是临床上可用的药物载体,可以有效地运输多种疏水和亲水药物。然而外泌体的低产量限制了其临床转化前景<sup>[29-30]</sup>。纳米囊泡是通过挤出法得到纳米级别的细胞来源囊泡,具有和外泌体类似特征功能,但产量较外泌



体高百倍<sup>[31]</sup>。笔者所在的研究团队利用挤出法成功制备了具有制备简单、产量很高、分布均一和稳定性好等工艺特性的BMSC-NV<sup>[32]</sup>。本研究采用挤出法成功合成了ICG-NV,其可通过促进细胞内吞作用显著增加GL261细胞对ICG的摄取量,有效克服了ICG在水溶液中稳定性差的缺陷。因此,相较于单独使用ICG,ICG-NV在SDT中展现出更显著的疗效,且SDT诱导的ICD效果也有所增强。

纳米囊泡在全身给药24 h内即从血液循环和肝组织中迅速清除<sup>[33]</sup>。ICG-NV也可能以剂量依赖性的方式诱导预期外的毒性。因此,亟须开发安全的声敏剂封装载体,实现持续的全身递送,延长ICG-NV的生物利用度,减少给药次数,这对于促进SDT的临床使用至关重要。水凝胶是由高分子聚合物形成的亲水性三维空间网状结构,可吸收大量水分,通过被动扩散机制控制包封药物的释放速率<sup>[12,16]</sup>。利用水凝胶来延长药物释放周期和增强纳米载体的稳定性,已经成为广泛研究的课题。HA作为ECM的主要成分之一,被广泛用于水凝胶给药系统。HA分子的双糖重复单元在具有良好的生物相容性的基础上,易于功能化与药物接枝,控制药物的释放行为或形成可注射的水凝胶,也可填充不规则形状的伤口<sup>[34-36]</sup>。同时,对于GBM治疗来说,水凝胶是最合适的支架之一,因为它们具有模拟脑组织的超高含水量和柔软的机械性能,有利于神经组织的生长<sup>[37]</sup>。本研究发现,水凝胶包裹的ICG-NV在体外SDT中与ICG-NV引发的ICD效果相当。而ICG-NV@SeHA还具有以下优势:(1)提高囊泡稳定性,水凝胶能够保护ICG-NV的完整性,增强其稳定性;(2)提升囊泡靶向性,HA水凝胶的可注射性使得ICG-NV能够直接注射至目标组织,克服了ICG-NV血液循环时间短和靶向性不足的问题,实现高效靶向,同时减少手术切除后空腔引起的并发症;(3)实现ICG-NV的缓释,HA水凝胶的结合能够用于药物的控制释放,实现ICG的缓慢释放,提高药物疗效和作用持续时间。因此可以推测,在体内环境中,ICG-NV@SeHA应较ICG-NV有更优的治疗效果。

虽然本研究取得了初步成果,但仍存在局限性:目前的研究主要集中在体外实验,这些实验结果揭示了细胞层面的SDT效果和免疫反应,而ICG-NV@SeHA在体内的治疗效果和免疫能力的长期建立与稳定性尚需进行充分探索。因此,未来的研究将采用动物实验以全面评估该材料在胶质瘤动物模型中的疗效,包括其在体内的稳定性、肿瘤靶向性、缓释效果以及长期免疫反应等关键因素。

总体而言,本研究初步证实了ICG-NV@SeHA

联合超声处理能有效杀伤GL261细胞,并且可能通过激活机体的免疫反应来增强对肿瘤细胞的杀伤。这些发现为ICG-NV@SeHA作为一种新型生物材料在治疗胶质瘤复发和转移方面的研究提供了实验基础,而其临床应用的可行性和有效性还需要进行更深入的研究。

## [参考文献]

- [1] MCKINNON C, NANDHABALAN M, MURRAY S A, *et al.* Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management [J/OL]. *BMJ*, 2021, 374: n1560 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34261630/>. DOI:10.1136/bmj.n1560.
- [2] DONG Y M, ZHANG J, WANG Y, *et al.* Intracavitary spraying of nanoregulator-encased hydrogel modulates cholesterol metabolism of glioma-supportive macrophage for postoperative glioblastoma immunotherapy[J/OL]. *Adv Mater*, 2024, 36(13): e2311109 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38127403/>. DOI: 10.1002/adma.202311109.
- [3] LAH T T, NOVAK M, BREZNIK B. Brain malignancies: glioblastoma and brain metastases[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60: 262-273. DOI:10.1016/j.semcancer.2019.10.010.
- [4] BLEEKER F E, MOLENAAR R J, LEENSTRA S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma[J]. *J Neurooncol*, 2012, 108(1): 11-27. DOI:10.1007/s11060-011-0793-0.
- [5] CHEN Q, WANG C, ZHANG X D, *et al.* In situ sprayed bioresponsive immunotherapeutic gel for post-surgical cancer treatment[J]. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14(1): 89-97. DOI:10.1038/s41565-018-0319-4.
- [6] ZHANG T Y, LIN R Y, WU H H, *et al.* Mesenchymal stem cells: a living carrier for active tumor-targeted delivery[J/OL]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 185: 114300 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35447165/>. DOI:10.1016/j.addr.2022.114300.
- [7] LI L H, NEAVES W B. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4553-4557. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3986.
- [8] ZHANG J, CHEN C, LI A N, *et al.* Immunostimulant hydrogel for the inhibition of malignant glioma relapse post-resection[J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16(5): 538-548. DOI:10.1038/s41565-020-00843-7.
- [9] WANG H L, LI X X, TSE B W, *et al.* Indocyanine green-incorporating nanoparticles for cancer theranostics[J]. *Theranostics*, 2018, 8(5): 1227-1242. DOI:10.7150/thno.22872.
- [10] ZHOU Y, JIAO J J, YANG R Y, *et al.* Temozolomide-based sonodynamic therapy induces immunogenic cell death in glioma[J/OL]. *Clin Immunol*, 2023, 256: 109772 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37716612/>. DOI:10.1016/j.clim.2023.109772.
- [11] XIAO H, LI X X, LI B, *et al.* Nanodrug inducing autophagy inhibition and mitochondria dysfunction for potentiating tumor photo-immunotherapy[J/OL]. *Small*, 2023, 19(30): e2300280 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37060227/>. DOI: 10.1002/sml.202300280.
- [12] LI G, ZHANG Y Y, GUO H, *et al.* Epitaxial growth and physical properties of 2D materials beyond graphene: from monatomic materials to binary compounds[J]. *Chem Soc Rev*, 2018, 47(16): 6073-6100. DOI:10.1039/c8cs00286j.

- [13] ZHONG R, TALEBIAN S, MENDES B B, *et al.* Hydrogels for RNA delivery[J]. *Nat Mater*, 2023, 22(7): 818-831. DOI: 10.1038/s41563-023-01472-w.
- [14] VEGA S L, KWON M Y, BURDICK J A. Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering[J]. *Eur Cell Mater*, 2017, 33: 59-75. DOI:10.22203/eCM.v033a05.
- [15] YUAN L, WU Y, GU Q S, *et al.* Injectable photo crosslinked enhanced double-network hydrogels from modified sodium alginate and gelatin[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 96: 569-577. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.058.
- [16] LI W J, BEI Y, PAN X Q, *et al.* Selenide-linked polydopamine-reinforced hybrid hydrogels with on-demand degradation and light-triggered nanozyme release for diabetic wound healing[J/OL]. *Biomater Res*, 2023, 27(1): 49 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37202774/>. DOI:10.1186/s40824-023-00367-w.
- [17] XU X X, LU W H, ZHU J, *et al.* An on-demand dissoluble chitosan hydrogel containing dynamic diselenide bond[J/OL]. *Gels*, 2021, 7(1): 21 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33672440/>. DOI: 10.3390/gels7010021.
- [18] 张丹. 抗氧化透明质酸水凝胶对脑损伤小鼠的神经功能恢复作用研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2022. DOI: 10.27466/d.cnki.gzzdu.2022.003199.
- [19] YANG Y, ZHU Y F, WANG K R, *et al.* Activation of autophagy by in situ Zn<sup>2+</sup> chelation reaction for enhanced tumor chemoimmunotherapy[J]. *Bioact Mater*, 2023, 29: 116-131. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.06.022.
- [20] YUAN H, MA J, HUANG W, *et al.* Antitumor effects of a distinct sonodynamic nanosystem through enhanced induction of immunogenic cell death and ferroptosis with modulation of tumor microenvironment[J]. *JACS Au*, 2023, 3(5): 1507-1520. DOI: 10.1021/jacsau.3c00156.
- [21] KADIYALA P, LI D, NU'EZ F M, *et al.* High-density lipoprotein-mimicking nanodiscs for chemo-immunotherapy against glioblastoma multiforme[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(2): 1365-1384. DOI:10.1021/acsnano.8b06842.
- [22] CHEN C, JING W Q, CHEN Y, *et al.* Intracavity generation of glioma stem cell-specific CAR macrophages primes locoregional immunity for postoperative glioblastoma therapy[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(656): eabn1128 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35921473/>. DOI:10.1126/scitranslmed.abn1128.
- [23] BASTIANCICH C, BIANCO J, VANVARENBERG K, *et al.* Injectable nanomedicine hydrogel for local chemotherapy of glioblastoma after surgical resection[J]. *J Control Release*, 2017, 264: 45-54. DOI:10.1016/j.jconrel.2017.08.019.
- [24] WANG J D, MA J Y, XIE F Y, *et al.* Immunogenic cell death-based cancer vaccines: promising prospect in cancer therapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1389173 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38745666/>. DOI:10.3389/fimmu.2024.1389173.
- [25] WANG T, PENG W R, DU M, *et al.* Immunogenic sonodynamic therapy for inducing immunogenic cell death and activating antitumor immunity[J/OL]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1167105 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37168380/>. DOI: 10.3389/fonc.2023.1167105.
- [26] CAO T G N, KANG J H, YOU J Y, *et al.* Safe and targeted sonodynamic cancer therapy using biocompatible exosome-based nanosensitizers[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(22): 25575-25588. DOI:10.1021/acsami.0c22883.
- [27] LIN X H, SONG J B, CHEN X Y, *et al.* Ultrasound-activated sensitizers and applications[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59(34): 14212-14233. DOI:10.1002/anie.201906823.
- [28] MONDAL J, PILLARISSETTI S, JUNNUTHULA V, *et al.* Hybrid exosomes, exosome-like nanovesicles and engineered exosomes for therapeutic applications[J]. *J Control Release*, 2023, 353: 1127-1149. DOI:10.1016/j.jconrel.2022.12.027.
- [29] KIM H Y, KIM T J, KANG L M, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived magnetic extracellular nanovesicles for targeting and treatment of ischemic stroke[J/OL]. *Biomaterials*, 2020, 243: 119942 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32179302/>. DOI:10.1016/j.biomaterials.2020.119942.
- [30] CHEN Y S, LIN E Y, CHIOU T W, *et al.* Exosomes in clinical trial and their production in compliance with good manufacturing practice[J]. *Tzu Chi Med J*, 2019, 32(2): 113-120. DOI:10.4103/tcmj.tcmj\_182\_19.
- [31] ZHANG Y, ZHANG X Q, YANG H C, *et al.* Advanced biotechnology-assisted precise sonodynamic therapy[J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(20): 11227-11248. DOI:10.1039/d1cs00403d.
- [32] PANG L Y, JIN H, LU Z M, *et al.* Treatment with mesenchymal stem cell-derived nanovesicle-containing gelatin methacryloyl hydrogels alleviates osteoarthritis by modulating chondrogenesis and macrophage polarization[J/OL]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(17): e2300315 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36848378/>. DOI:10.1002/adhm.202300315.
- [33] IMAI T, TAKAHASHI Y, NISHIKAWA M, *et al.* Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice[J/OL]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 26238 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25669322/>. DOI:10.3402/jev.v4.26238.
- [34] LIU X Y, WU C H, ZHANG Y S, *et al.* Hyaluronan-based hydrogel integrating exosomes for traumatic brain injury repair by promoting angiogenesis and neurogenesis[J/OL]. *Carbohydr Polym*, 2023, 306: 120578 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36746568/>. DOI:10.1016/j.carbpol.2023.120578.
- [35] CHANDRA J, MOLUGULU N, ANNADURAI S, *et al.* Hyaluronic acid-functionalized lipoplexes and polyplexes as emerging nanocarriers for receptor-targeted cancer therapy[J/OL]. *Environ Res*, 2023, 233: 116506 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37369307/>. DOI:10.1016/j.envres.2023.116506.
- [36] HE D, LI H Y. Bifunctional Cx43 mimic peptide grafted hyaluronic acid hydrogels inhibited tumor recurrence and stimulated wound healing for postsurgical tumor treatment[J/OL]. *Adv Funct Mater*, 2020, 30(51): 2004709 [2024-09-24]. <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.202004709>. DOI:10.1002/adfm.202004709.
- [37] WANG L Y, ZHANG D, REN Y K, *et al.* Injectable hyaluronic acid hydrogel loaded with BMSC and NGF for traumatic brain injury treatment[J]. *Mater Today Bio*, 2021, 13: 100201 [2024-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35024600/>. DOI: 10.1016/j.mtbio.2021.100201.

[收稿日期] 2024-09-24

[修回日期] 2025-03-11

[本文编辑] 黄静怡