

基于Zr-MOF负载PPa用于改善光动力疗效

郭颖, 金英学*

哈尔滨师范大学化学化工学院, 黑龙江 哈尔滨
Email: jyxprof@163.com

收稿日期: 2021年1月6日; 录用日期: 2021年2月24日; 发布日期: 2021年3月4日

摘要

焦脱镁叶绿酸-a (PPa)是光动力治疗(PDT)中的第二代光敏剂。但游离的PPa仍存在一些缺陷, 导致临床疗效降低, 如在生理环境下容易自聚集, 在肿瘤组织中积累较差。为了解决这些问题, 我们通过溶剂法和自组装的方法构建了一种基于聚烯丙胺盐酸盐(PAH)修饰的以Zr⁴⁺为中心离子, 2-氨基对二苯甲酸为骨架(Zr-MOF)负载PPa (Zr-MOF-PPa@PAH)的光动力治疗纳米平台。Zr-MOF-PPa@PAH具有良好的包封效率、有效的细胞吸收能力和良好的生物相容性。此外, 体外细胞摄取实验表明, Zr-MOF-PPa@PAH纳米材料可以加速PPa药物进入肿瘤细胞核, 药物释放行为具有pH敏感性。对人肝癌细胞系HepG-2的MTT检测结果清楚表明, Zr-MOF-PPa@PAH复合材料在光照下能有效导致细胞损伤和凋亡细胞死亡, 纳米复合材料能提高PS类药物的PDT抗肿瘤作用, 但暗毒作用可以忽略。总之, 本研究制备出生物相容性好和全身毒性低的光动力治疗的纳米粒子, 提高了光动力疗效。

关键词

光动力治疗, 光敏剂, 金属有机框架材料, 癌症

Improvement of the Photodynamic Efficacy Based on Zr-MOF Loaded PPa

Ying Guo, Yingxue Jin*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Normal University, Harbin Heilongjiang
Email: jyxprof@163.com

Received: Jan. 6th, 2021; accepted: Feb. 24th, 2021; published: Mar. 4th, 2021

Abstract

Pyropheophorbide-a (PPa) is the second generation photosensitizer in photodynamic therapy

*通讯作者。

(PDT). But free of PPa there are still some defects, which leads to reduced clinical curative effect. For example, it is easy to self-aggregate in the physiological environment and accumulates poorly in the tumor tissue. In order to solve these problems, we constructed a photodynamic therapy nanoplatform based on polyallylamine hydrochloride (PAH) modified with Zr^{4+} as the central ion and 2-amino p-benzoic acid as the skeleton (Zr-MOF) to support PPa (Zr-MOF-PPa@PAH), by solvent method and self-assembly method. Zr-MOF-PPa@PAH has good encapsulation efficiency, effective cell absorption capacity and good biocompatibility. In addition, the cells *in vitro* experiments show that the intake Zr-MOF-PPa@PAH nanomaterials can accelerate PPa drugs into the tumor cell nucleus, and drug release behavior is pH sensitive. The results of MTT assay on human hepatoma cell line HepG-2 clearly show that Zr-MOF-PPa@PAH composites under light can cause cell injury and apoptotic cell death, nano composite materials can improve the PDT of PS drugs' antitumor effect, but the dark poison effect can be ignored. In conclusion, the photodynamic therapy nanoparticles with good biocompatibility and low systemic toxicity were prepared in this study, which improved the photodynamic efficacy.

Keywords

Photodynamic Therapy, Photosensitizer, Metal Organic Framework Materials, Cancer

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

癌症是严重危害人类健康的常见病。传统的肿瘤治疗方法如化疗、放疗、手术常常伴有副作用高、易复发、治疗效率低、耐药性大等缺点[1] [2] [3]。光动力治疗(PDT)作为一种新的治疗方法,它具有选择性高、治疗效果快、耐药小的优点而备受关注[4]。光源、光敏剂和氧气是光动力疗法的基本要素[5]。其原理为:光敏剂(Ps)在适当波长光辐照下,从基态跃迁到三重激发态(3Ps), 3Ps 与周围氧分子发生能量转移,产生具有细胞毒性的活性氧(ROS),产生的ROS能立即破坏肿瘤细胞内的蛋白质分子和核酸,引起细胞凋亡或坏死[6]。在光动力疗法中,光敏剂占据至关重要的作用。已有报道使用天然叶绿素降解产物叶绿酸(PPa)为PDT光敏剂[7] [8]。PPa可用于荧光成像,具有较高的单态氧量子产率、良好的生物相容性和较强的组织穿透能力,表现出良好的PDT效率[9]。但是,由于其分子小、水溶性差、在生理环境下容易聚集等缺点,限制其广泛应用到肿瘤治疗中[10]。近年来,金属有机框架(MOFs)在气体储存、化学分离、催化转化、磁性、传感、锂离子储存、智能材料和药物传递等方面具有广泛的应用前景[11] [12] [13] [14] [15]。特别是在生物医学领域方面,金属有机框架的良好生物相容性和低毒性优势明显。在光动力中、药物释放中具有广泛应用[16] [17] [18]。付鑫伟等[19]利用金属有机框架(ZIF-8)负载二氢卟吩类光敏剂(Ce6),解决了光敏剂在肿瘤组织中容易聚集的问题。刘志亮等[20]合成了不同纳米尺度改性的金属有机框架(UIO-66-NH₂)考察了它对5-FU的负载能力和释放能力,结果表明它成功负载5-FU和对5-FU的控释能力。

在本文中,我们采用溶剂热法和物理搅拌法制得Zr-MOF-PPa@PAH,我们验证了ZZr-MOF-PPa@PAH在癌细胞中产生ROS的能力。此外,我们还研究了Zr-MOF-PPa@PAH的体外PDT效率、细胞吸收能力。经实验证实,Zr-MOF作为纳米载体克服了游离PPa在生理环境下容易结块的局限性,提高了PDT的效

率。此外, PAH 修饰提高了 Zr-MOF 的稳定性和生物相容性, 延长了血液循环时间。因此, 我们新设计的 PPa 传递系统可能是一个很有前途的肿瘤纳米药物 PDT 平台。

2. 实验部分

2.1. 实验药品及仪器

2.1.1. 实验药品

N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、乙酸、乙醇、甲醇均为分析纯品; 实验室自制的焦脱镁叶绿酸-a (PPa) 无需纯化即可直接使用。2-氨基对苯二甲酸(98%)、 $ZrCl_4$ (97%)、亚甲基蓝(MB 99%)、PAH ($M_w = 15,000\sim 18,000$)、1,3-二苯异苯呋喃(DPBF, 97%) [上海麦克莱林生化技术有限公司]。4',6-二脒基-2 苯基吡啶(DAPI 高效液相色谱法 90%)、2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA 98%)、MTT (97%)、高糖培养基(DMEM)、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、AM/PIA 双染色试剂[哈尔滨百杰斯生物公司]。人肝癌细胞 HepG-2 由哈尔滨工业大学提供。

2.1.2. 仪器

扫描电子显微镜(SEM) (日立 S-4800, 日立有限公司, 日本); 透射电镜(TEM, Tecnai G2 f200s-twin); 紫外-可见分光光度计(日立有限公司, 日本); 傅里叶变换红外光谱仪(FTIR) (布鲁克公司, 德国); D5005 型 X 射线衍射仪(西门子, 德国); 酶标仪(WD-2102A, 北京六一; 物科技有限公司); 荧光倒置显微镜(DM IL IED, Leica HistoCore PEARL); X 射线光电子能谱(日本 UIVAC-PHI 公司)。

2.2. 化学合成

2.2.1. Zr-MOF 的合成

本文采用溶剂热法合成了 MOF。2-氨基对苯二甲酸(NH_2 -BDC) (108.6 mg)溶于 DMF (5 mL)。八水氯化锆($ZrCl_4$) (56.2 mg)溶于 DMF (5 mL)。两种溶液在高压反应釜中混合, 并在反应混合物中加入醋酸(1.0 mL)。溶液在 120°C 加热 24 小时, 产生 MOF。然后对样品进行纯化, 离心(9000 rpm, 20 min)收集, 然后进行溶剂交换($3 \times$ DMF), 提取 NPs 孔内残留的 DMF, 将沉淀浸泡在丙酮中 24 h。此过程重复 2 次。然后将样品粉末在室温下真空干燥。

2.2.2. Zr-MOF-PPa@PAH 的合成

将 20 mg MOF 纳米材料分散于 20 mL 乙醇中, 超声分散 30 min。然后加入 5 mL PPa 乙醇溶液(1 mg/mL), 室温下避光搅拌 24 h, 样品经纯化后离心(9000 rpm, 20 min), 然后进行溶剂交换($3 \times$ 乙醇, $3 \times$ 水)。20 mg MOF-PPa 在水中分散, 超声分散 30 min。PAH 水溶液($M_w = 18,000$, 5 mL, 20 mg)用 NaOH 溶液(2 M)调节 pH 值为 7.25。然后将 PAH 溶液加入到上述 Zr-MOF-PPa 溶液中, 在室温下混合, 避光搅拌过夜。将获得的 Zr-MOF-PPa@PAH 纳米颗粒用水洗涤几次, 样品离心(9000 rpm, 20 min), 真空干燥。

2.3. 粒径、电位和稳定性的试验

利用动态光散射仪(DLS)测定 50 μ g/mL MOF-PPa 的粒径、电位及在含有 10% FBSDMEM 和 PBS 的稳定性试验。

2.4. PPa 的 pH 的响应释放实验

称取 30 mg Zr-MOF-PPa@PAH, 放入透析袋中, 一份加入 10 mL pH = 7.4 的 PBS (0.01 M)缓冲溶液, 一份加入 10 mL pH = 6.4 的 PBS (0.01 M)缓冲溶液, 一份将 PBS 加入 10 mL pH = 5.6 的 PBS (0.01 M)缓

冲溶液缓冲液, 放于磁力搅拌器上保持恒温 37℃, 并以 100 rpm 的搅拌。从 0~12 小时, 每隔 1 小时分别取样用紫外-可见分光光度计测量波长 670 nm 处的峰的吸光度, 计算 PPa 的释放量。

2.5. Zr-MOF-PPa@PAH 单线态氧的测定

用 DPBF (在 DMF 中 1 mg/mL) 为 $^1\text{O}_2$ 捕获剂, 以 MB 为参比样品, 测定 PPa, Zr-MOF-PPa@PAH 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率。首先, 固定待测样品和 MB 在 671 nm 处的吸收相同, 约为 0.10 OD。然后分别加入 DPBF (30 μL), 经 670 nm 激光照射(功率密度为 0.1 W/cm^2), 测量在不同时间 DPBF 溶液在 415 nm 吸光度, 计算随辐照时间的衰减速率 $\ln(A_0/A_t)$, 拟合出一阶线性方程。按公式(1)计算光敏剂的 $^1\text{O}_2$ 量子产率。

$$\Phi_s = \Phi_{\text{MB}} \frac{t_{\text{MB}}}{t_s} \quad (1)$$

其中 t_s 和 t_{MB} 分别为待测样品和 MB 存在时 DPBF 的吸收降低至一阶指数衰减的时间。 Φ_{MB} 为 MB 在 DMF 中的 $^1\text{O}_2$ 量子产率, 定为 0.49。求得样品 Zr-MOF-PPa@PAH 和自由 PPa 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率分别为 38.4% 和 53.6%。

2.6. 细胞培养

肝癌细胞(HepG-2)在含 10% 胎牛血清和 1% 100 mg/mL 抗生素(青霉素链霉素)的 DMEM 中培养, 37℃, 95% 的湿度和 5% 的 CO_2 。DMEM 培养基每 2 天更换一次。在所有的实验中, 细胞用胰蛋白酶从培养板上消化, 然后重悬在新鲜培养基中培养。

2.7. 细胞毒性检测

将 HepG-2 细胞置于 DMEM 中 96 孔(100 μL , 4000 个细胞)中。每孔孵育 24 h。然后将不同浓度的 PPa 或 Zr-MOF-PPa@PAH 孵育细胞, PPa 的浓度为(0.625, 1, 1.25, 2.5, 3.75, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时。细胞与不同浓度的孵化 PSs 4 h 和暴露于光线 10 分钟(通过 670 nm 过滤器氙灯, 10 mW/cm^2)。照射后, 细胞在 pH = 7.4 的 DMEM 中继续培养 24 小时。丢弃全部液体, 将细胞置于含 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯四唑溴化(MTT, C = 0.5 mg/mL)的培养基中孵育 4 h, 将 150 μL 二甲基亚砷(DMSO)加入到溶出的紫色甲砷中, 用酶标仪在 490 nm 波长下检测吸光度(A)值。细胞存活率(%)按下式计算:

$$\text{细胞存活率}(\%) = A_s/A_c \times 100\%$$

暗毒对照组与未辐照实验组相同。

2.8. Zr-MOF-PPa@PAH 的细胞摄取

将 HepG-2 细胞接种于 6 孔细胞培养板(每孔 1×10^5 个细胞), 孵育 24 小时。Zr-MOF-PPa@PAH 在 37℃ 下分别孵育 15、30、60、75 和 180 min。弃去培养基, PBS 洗 3 次, 2.5% 戊二醛固定 10 分钟。弃去戊二醛溶液, PBS 洗 3 次。后用 2 mg/mL DAPI 对 HepG-2 细胞进行 10 分钟染色。最后用 PBS 冲洗三次以去除 DAPI 染料后, 盖上玻璃, 放在载玻片上, 使用倒置显微镜进行荧光成像。

2.9. Zr-MOF-PPa@PAH 在细胞内活性氧($^1\text{O}_2$)观察

DCFH-DA 为单线态氧 $^1\text{O}_2$ 探针, 在 488 nm 激发下发出绿色荧光。用 1 mL 含 Zr-MOF-PPa@PAH 的 DMEM, PPa 浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理六孔板上的粘附 HepG-2 细胞(细胞密度为 1×10^5), 孵育 2 h。PBS 洗 2 次, 50 μM DCFH-DA 孵育 30 min。PBS 洗 3 次, 然后用 670 nm 激光, 功率密度为 10 mW/cm^2 的光照射 0、2、3、6、10 min。曝光后用 PBS 洗 3 次, 立即用 FIM 观察。

2.10. 活死细胞双染色实验

将 HepG-2 细胞接种于 6 孔细胞培养板(每孔 1×10^5 个细胞), 孵育 24 小时。用 1 mL 含 PPa、Zr-MOF-PPa@PAH 的 DMEM, PPa 浓度为 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 处理六孔板上的粘附 HePG-2 细胞(细胞密度为 1×10^5), 不同的材料经过 3 个小时的吞噬作用, 细胞与 PBS 冲洗三次, 然后 1 mL PBS, 用 670 nm 光照射 0、2、5、10 min, 加入 AM (2 mmol/L)和 PI (4 mmol/L)孵育 15 分钟。孵育 15 分钟后进行 FIM 分析。

3. 结果与讨论

3.1. Zr-MOF-PPa@PAH 的表征

用 SEM 和 TEM 拍摄了 Zr-MOF-PPa@PAH 的形态(如图 1(a))。Zr-MOF-PPa@PAH 的表面光滑, 纳米的平均粒径为 68 nm, 动态光散射(DLS)表明 Zr-MOF-PPa@PAH 在去离子水中的粒径为 98 nm (如图 1(b))。如图 1(c)可知, Zr-MOF、Zr-MOF-PPa、Zr-MOF-PPa@PAH 的 Zeta 电位分别为 $-22.1 \pm 1.12 \text{ eV}$ 、 $-13.12 \pm 1.5 \text{ eV}$ 、 20.7 ± 1.08 , 由于 PAH 为盐酸盐, 带有大量正电荷, 产生电位反转。在 7 天内 Zr-MOF-PPa@PAH 在含有血清的培养基和 PBS 中尺寸没有显著的变化(如图 1(d))。

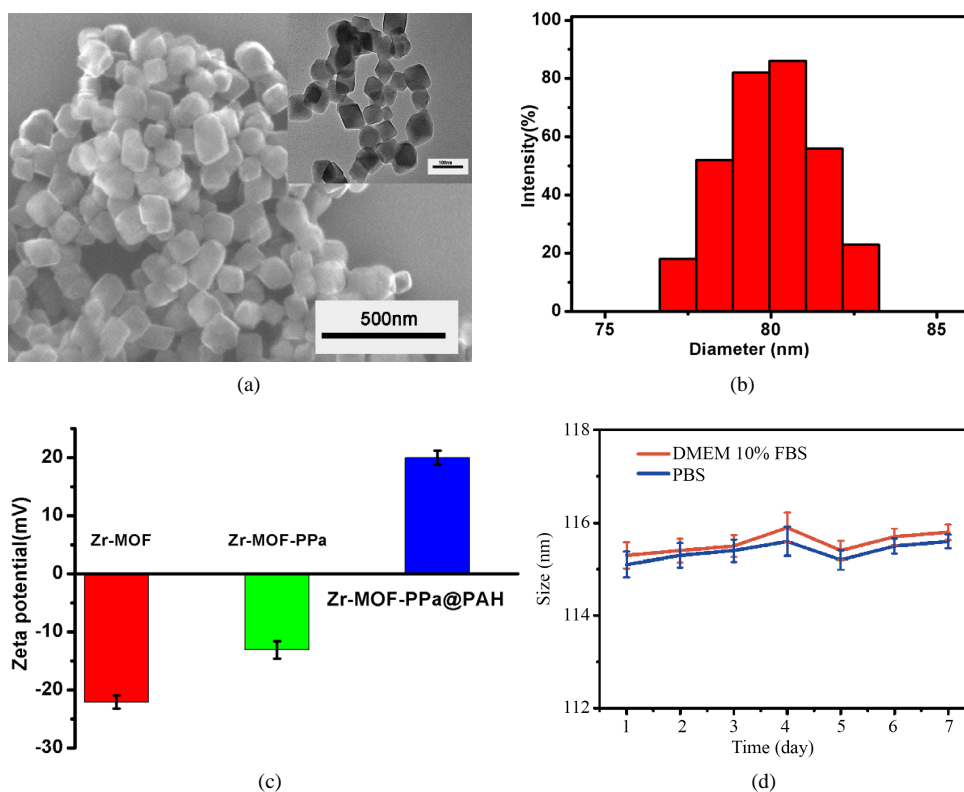


Figure 1. (a) SEM image of Zr-MOF-PPa@PAH. Inset is the TEM image; (b) DLS of Zr-MOF-PPa@PAH; (c) Zeta of Zr-MOF, Zr-MOF-PPa, Zr-MOF-PPa@PAH; (d) The hydrodynamic value of Zr-MOF-PPa@PAH was cultured in PBS or DMEM (containing 10% FBS) for 7 days

图 1. (a) Zr-MOF-PPa@PAH 的 SEM 图像。插图是 TEM 图像; (b) Zr-MOF-PPa@PAH 的 DLS; (c) Zr-MOF、Zr-MOF-PPa、Zr-MOF-PPa@PAH Zeta 电位图; (d) Zr-MOF-PPa@PAH 的水动力大小在 PBS 或 DMEM (含 10% 胎牛血清)中培养 7 天

如图 2(a)为傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR), Zr-MOF 在 3100~3550

cm^{-1} 有强振动峰, 归属于羧基和氨基伸缩振动峰, 双峰是伯氨基的 N-H 伸缩振动特征峰。1574 cm^{-1} 为苯环骨架上 C=C 双键的伸缩振动, 1386 cm^{-1} , 1258 cm^{-1} 分别为 C-O 单键和 C-N 单键的伸缩振动, 690~900 cm^{-1} 三个峰为 1,2,4-三取代苯环的 C-H 面外弯曲振动, 1528 cm^{-1} 峰为 PAH 的亚甲基 C-H 变形振动峰, 1100 cm^{-1} 的峰为 C-C 单键骨架振动峰。这些特征峰在 Zr-MOF-PPa@PAH 的红外吸收曲线上中均有对应的峰, 证明成功地得到 Zr-MOF-PPa@PAH。如图 2(b) 为纳米材料的 X-射线衍射(XRD), Zr-MOF 在 $2\theta = 7^\circ, 8^\circ, 12^\circ, 26^\circ$ 处特征峰均与文献报道的相符[21], $2\theta = 7^\circ$ 峰对应晶面(111), $2\theta = 8^\circ$ 峰对应晶面(200)。尖锐的峰型表明 Zr-MOF 是高度结晶体。Zr-MOF-PPa@PAH 的衍射峰均与 Zr-MOF 的衍射峰相同, 说明表面 PAH 化晶体的结构没有发生变化, 具有结构稳定性。图 2(c) 为 Zr-MOF-PPa@PAH 的 X 射线光电子能谱。由图可知, Zr-MOF-PPa@PAH 中存在 C、O、N、Zr 元素。Zr-MOF、Zr-MOF-PPa@PAH、PPa 的紫外吸收光谱如图 2(d) 所示, Zr-MOF 在可见光及红外光区没有吸收, PPa 在可见光区 400~800 nm 有 5 个吸收峰, 其中 400 nm 附件有一个最强的吸收峰, 在 660 nm 附近有次强峰, 其余 3 个吸收峰在 500~630 nm 区域, 这些峰是 PPa (卟吩类化合物) 的特征峰。Zr-MOF-PPa@PAH 在 400~800 nm 也有 5 个吸收峰, 在 400 nm 处有一个最强的吸收峰, 在 680 nm 处有一个次强峰, 说明 PPa 成功负载于 Zr-MOF 上, 并且 660 nm 峰红移了 10 nm, 这可能是 Zr-MOF 材料的中心离子与 PPa 络合的结果。

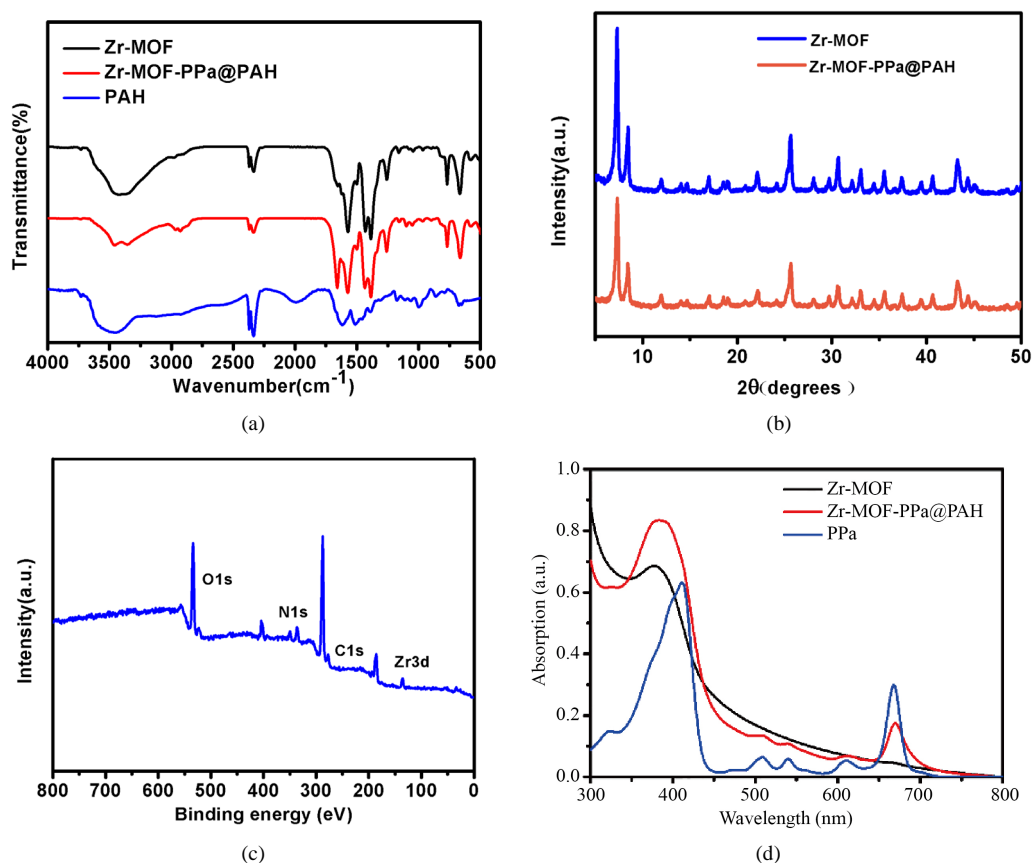


Figure 2. (a) FT-IR spectrum of Zr-MOF, Zr-MOF-PPa@PAH, PAH; (b) XRD diffraction spectra of Zr-MOF, Zr-MOF-PPa@PAH; (c) XPS spectra of Zr-MOF-PPa@PAH; (d) UV-vis spectrum of Zr-MOF, Zr-MOF-PPa@PAH, PPa

图 2. (a) Zr-MOF、Zr-MOF-PPa@PAH、PAH 的红外吸收光谱; (b) Zr-MOF、Zr-MOF-PPa@PAH 的 XRD 衍射谱; (c) Zr-MOF-PPa@PAH 的 XPS 能谱; (d) Zr-MOF、Zr-MOF-PPa@PAH、PPa 的紫外-可见光吸收光谱

3.2. Zr-MOF-PPa@PAH 的活性氧($^1\text{O}_2$)量子产率

光敏剂 PPa 在 660 nm 的激光照射下产生活性氧($^1\text{O}_2$)。我们以 DPBF 为活性氧($^1\text{O}_2$)探针, 亚甲基蓝(MB)为参照光敏剂, 测量 Zr-MOF-PPa@PAH 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率。DPBF 在 415 nm 处有很强的吸收, 当 DPBF 被活性氧化降解吸收峰逐渐减弱直至消失。将 DPBF 和与待测样品混合后光照, DPBF 吸光度变化和降解速率与时间关系图如图 3(a), 图 3(b)所示, DPBF 降解显著, Zr-MOF-PPa@PAH 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率为 38.6%, 单独 PPa 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率 58.4%, Zr-MOF-PPa@PAH 的 $^1\text{O}_2$ 量子产率低的原因可能是是纳米载体接受了部分 PPa 的能量, 导致 PPa 与 O_2 分子之间的能量转移效率降低。虽然量子产率低了, 但是 Zr-MOF 载体抑制了 PPa 因疏水性导致的自聚荧光猝灭现象, 从而有利于提高光动力治疗的效果。

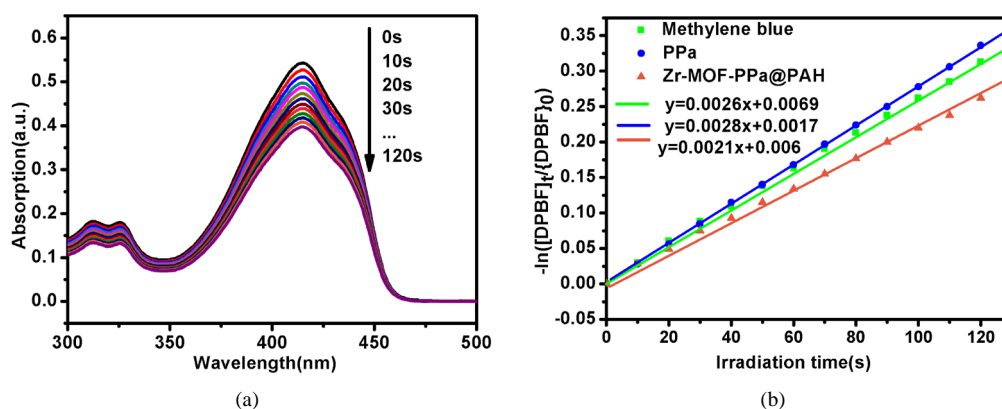


Figure 3. (a) UV-vis absorption spectra of decomposition of DPBF after irradiation of the Zr-MOF-PPa@PAH NPs in DMF; (b) First-order plots for the photodecomposition of PPa, Zr-MOF-PPa@PAH and MB

图 3. (a) DPBF 在 Zr-MOF-PPa@PAH NPs 的 DMF 溶液中光降解紫外 - 可见光光; (b) DPBF 降解速率与光照时间关系曲线

3.3. Zr-MOF-PPa@PAH 中 PPa 的 pH 响应释放

该纳米材料在化学上具有稳定性, 可在人体中性生理环境中随血液到达病变部位, 并可在肿瘤微环境中轻易释放, 避免对正常细胞的损伤。人体的生理环境约为 7.4, 肿瘤组织的 pH 值为 6.0~6.8, 而在某些细胞器和核内体中, pH 值可低至 5.2。因此, 我们在不同 pH 值(5.6, 6.5, 7.4)进行了释放实验。记录样品在 0~12 h 内释放 PPa 的量。如图 4 可以看出, pH 值为 5.6, PPa 的释放率最高, 6 h 释放率为 45.8%,

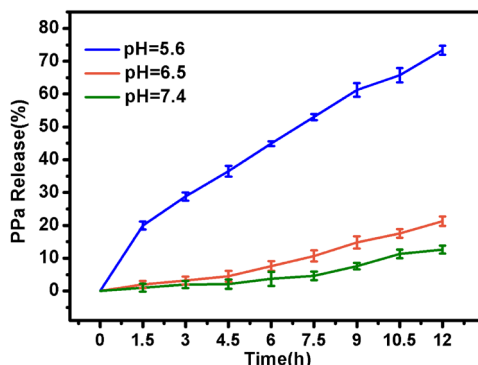


Figure 4. Zr-MOF-PPa@PAH is released in response to pH stimulation

图 4. Zr-MOF-PPa@PAH pH 刺激响应释放 PPa

12 释放率为 76%, pH = 7.4 时, PPa 的释放率最低, 综上所述, Zr-MOF-PPa@PAH 在酸性肿瘤微环境下能有效释放 PPa, 而在正常人体生理环境下释放较少。因此, 该 Zr-MOF-PPa@PAH 纳米粒子在正常生理环境下正常, 使能更好的在肿瘤部位聚集, 提高光动力疗效。

3.4. Zr-MOF-PPa@PAH 的细胞摄取及细胞内活性氧检测

在癌症治疗过程中纳米药物能否进入细胞内尤为重要。我们研究了 HepG-2 细胞对 Zr-MOF-PPa@PAH 纳米颗粒的吞噬行为。DAPI 为核染色剂, 在荧光倒置显微镜下显蓝色。Zr-MOF-PPa@PAH 纳米颗粒在荧光显微镜下显红色。用 Zr-MOF-PPa@PAH 处理 HepG-2 细胞, 在 CO₂ 培养箱孵育之后, 用荧光倒置显微镜下观察细胞的内化行为, 结果如图 5(a)所示。药物处理后 15 min 时, 细胞内有微弱的红色荧光出现, 表明 Zr-MOF-PPa@PAH 进入细胞内, 随着时间的延长, 细胞内红色荧光越来越强, 说明 Zr-MOF-PPa@PAH 完全进入细胞, 而在整个过程, 细胞状态没有发生变化, 说明 Zr-MOF-PPa@PAH 无暗毒性。清晰的活细胞红色荧光图像表明 Zr-MOF-PPa@PAH 能够成为细胞的荧光成像剂。

在前面已经讨论过关于 ¹O₂ 量子产率的问题(图 3), 但是细胞内生理环境复杂, 有多种因素影响 ¹O₂ 的产率。因此, 我们用 2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)作为 ROS 的检测器, 测试了 Zr-MOF-PPa@PAH 在细胞内产生 ¹O₂ 的能力[22]。DCFH-DA 可被细胞吸收, 细胞内酯酶水解为 DCFH, 再被 ROS 氧化为 7-二氯荧光素(DCF), 在 488 nm 的光激发下产生绿色荧光[23]。用 Zr-MOF-PPa@PAH 处理的实验组加入 DCFH-DA (50 μM), 并用 660 nm 激光(功率 10 mW/cm²)照射 10 分钟(图 5(b))。在荧光倒置显微镜下观察到, 10 分钟后发出绿色荧光非常强, 说明纳米粒子几乎都进入细胞, 在 660 nm 光照射下进入细胞后会产生大量 ¹O₂。说明 Zr-MOF-PPa@PAH 具有良好的产氧能力。

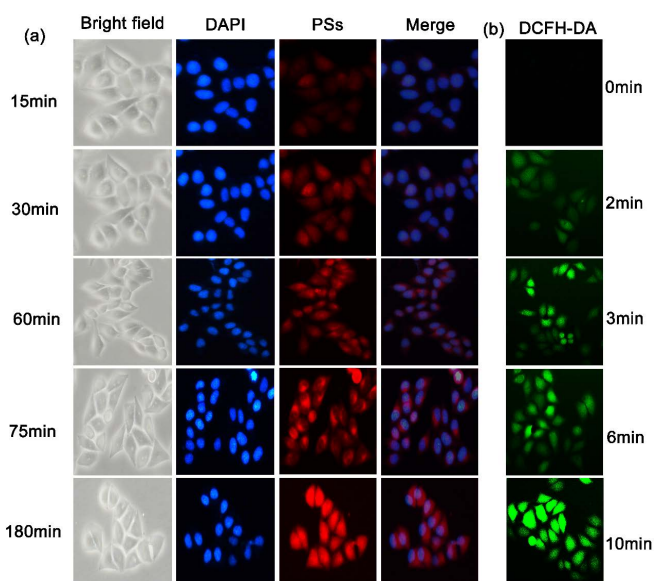


Figure 5. (a) Fluorescence imaging of HepG-2 cells after phagocytosis Zr-MOF-PPa@PAH; (b) DCFH-DA qualitative detection of reactive oxygen species in HepG-2 cells (¹O₂)

图 5. (a) HepG-2 细胞吞噬 Zr-MOF-PPa@PAH 后的荧光成像; (b) 用 DCFH-DA 定性检测 HepG-2 细胞内活性氧(¹O₂)

3.5. Zr-MOF-PPa@PAH 的 PDT 疗效

纳米材料作为药物传递系统, 要求其在运输过程中对机体具有低毒性或无毒性, 通过 MTT 法在

HePG-2 细胞中研究纳米粒子在无光和光照条件下的细胞毒性, 采用 MTT 法评价 MOF-PPa@MnO₂-PAH 纳米药物对 HePG-2 细胞的细胞毒性, 用 PPa 与含有相同 PPa 浓度的 Zr-MOF-PPa@PAH (0.625, 1, 1.25, 2.5, 3.75, 5 $\mu\text{g/mL}$) 纳米粒子处理 HePG-2 细胞, 验证该纳米粒子在光照与不光照下的细胞毒性。如图 6(a) 所示, 在无光照射下, PPa 与 Zr-MOF-PPa@PAH 纳米粒子处理后的 HePG-2 细胞的存活率将近 100%, 说明二者无暗毒性, 很安全。如图 5(b) 所示, 光照后, PPa 比 Zr-MOF-PPa@PAH 纳米粒子处理过的 HePG-2 细胞存活率要高, 这表明 Zr-MOF-PPa@PAH 具有良好的生物相容性, 更好的进入细胞, 解决单独 PPa 在生理环境下的自聚合, 提高了光动力疗效。

HePG-2 细胞双染可以清楚直观的反应上述两种物质的致死率(如图 6(b)), 在共聚焦激光扫描显微镜下, AM 染色的活细胞为绿色, PI 染色的死细胞为红色, 由此可见, 当用 670 nm 照射 10 min 后, PPa 处理的细胞显示出荧光变化微弱, 而用 Zr-MOF-PPa@PAH 处理过的细胞, 绿色急剧减少, 红色急剧增加, 表明处理后的细胞受到了明显的破坏, 这种结果与上述毒性结果一致, 经过纳米材料负载的光敏剂可以提高光动力疗效。

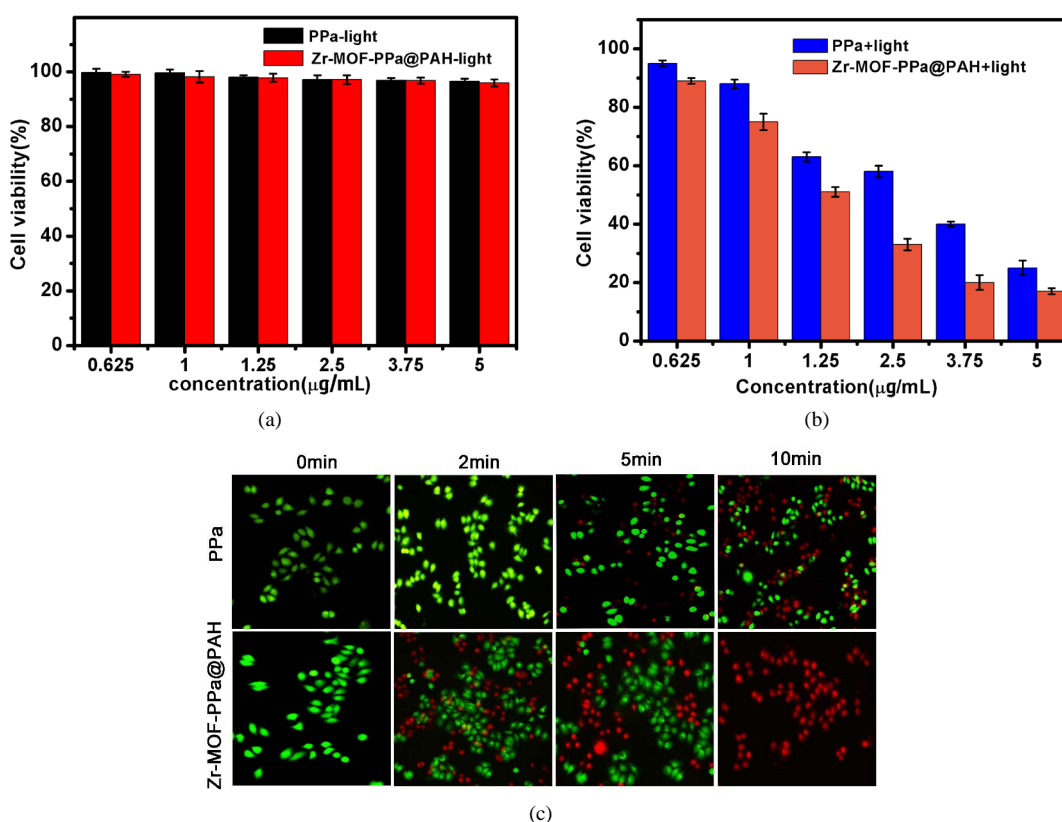


Figure 6. (a) Zr-MOF-PPa@PAH composite and free PPa with HepG-2 cells without irradiation; (b) In vitro PDT phototoxicity of Zr-MOF-PPa@PAH and free PPa to HepG-2 cells; (c) HepG-2 cell double staining assay cell imaging

图 6. (a) PPa、Zr-MOF-PPa@PAH 的无光照的柱状图; (b) PPa、Zr-MOF-PPa@PAH 的光照下的柱状图; (c) HepG-2 细胞双染色实验细胞成像

4. 结论

在本实验中, 我们合成了 Zr-MOF-PPa@PAH 纳米粒子, Zr-MOF 负载 PPa 解决了游离的 PPa 在生理环境下容易自聚集的缺陷, 从而提高了 PDT 疗效。此外, 细胞实验表明, Zr-MOF-PPa@PAH 不明显的

暗毒性和细胞内摄取行为进一步增加了其在临床实践中的应用潜力。简单的合成方法、良好的生物相容性和优异的 PDT 效率使 Zr-MOF-PPa@PAH 作为 PDT 肿瘤治疗的前景广阔。

参考文献

- [1] Allum, C.D., Stenning, W.H., Sally, P., Thompson, J.N., Van de Velde, C.J.H., Nicolson, M., *et al.* (2006) Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer. *New England Journal of Medicine*, **355**, 11-20. <https://doi.org/10.1056/nejmoa055531>
- [2] Diaz-Nieto, R., Orti-Rodríguez, R. and Winslet, M. (2013) Post-Surgical Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastric Cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **9**, Article ID: CD008415. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008415.pub2>
- [3] Denost, Q., Laurent, C., Paumet, T., Quintane, L., Martenot, M. and Rullier, E. (2012) Laparoscopic Surgery for Rectal Cancer: Preoperative Radiochemotherapy versus Surgery Alone. *Surgical Endoscopy*, **26**, 1878-1883. <https://doi.org/10.1007/s00464-011-2119-x>
- [4] Allison, R.R., Downie, G.H., Cuenca, R., Hu, X.H., Childs, C.J. and Sibata, C.H. (2004) Photosensitizers in Clinical pdt. *Photodiagnosis & Photodynamic Therapy*, **1**, 27-42. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9)
- [5] Vrouenraets, M.B., Visser, G.W., Snow, G.B., *et al.* (2003) Basic Principles, Applications in Oncology and Improved Selectivity of Photodynamic Therapy. *Anticancer Research*, **23**, 505-522.
- [6] Ding, H., Lv, Y., Wang, J., Tian, Z.Y., Wei, W. and Ma, G.H. (2015) Erythrocyte Membrane-Coated Nir-Triggered Biomimetic Nanovectors with Programmed Delivery for Photodynamic Therapy of Cancer. *Nanoscale*, **7**, 9806-9815. <https://doi.org/10.1039/C5NR02470F>
- [7] Zhou, H., Xia, L., Zhong, J., Xiong, S., Yi, X., Chen, L., *et al.* (2019) Plant-Derived Chlorophyll Derivative Loaded Liposomes for Tri-Model Imaging Guided Photodynamic Therapy. *Nanoscale*, **11**, 19823-19831. <https://doi.org/10.1039/C9NR06941K>
- [8] Wang, Q., Sun, M., Li, D., Li, C., Luo, C., Wang, Z., *et al.* (2020) Cytochrome P450 Enzyme-Mediated Auto-Enhanced Photodynamic Cancer Therapy of Co-Nanoassembly between Clopidogrel and Photosensitizer. *Theranostics*, **10**, 5550-5564. <https://doi.org/10.7150/thno.42633>
- [9] Zhang, J., Xu, M., Mu, Y., Li, J., Foda, M.F., Zhang, W., *et al.* (2019) Reasonably Retard O₂ Consumption through a Photoactivity Conversion Nanocomposite for Oxygenated Photodynamic Therapy. *Biomaterials*, **218**, Article ID: 119312. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119312>
- [10] Gandra, N., Abbineni, G., Qu, X., Huai, Y., Wang, L. and Mao, C. (2013) Bacteriophage Bionanowire as a Carrier for Both Cancer-Targeting Peptides and Photosensitizers and Its Use in Selective Cancer Cell Killing by Photodynamic Therapy. *Small*, **9**, 215-221. <https://doi.org/10.1002/smll.201202090>
- [11] Wang, C., Liu, D. and Lin, W. (2013) Metal-Organic Frameworks as a Tunable Platform for Designing Functional Molecular Materials. *Journal of the American Chemical Society*, **135**, 13222-13234. <https://doi.org/10.1021/ja308229p>
- [12] Li, J.R., Yu, J., Lu, W., *et al.* (2013) Porous Materials with Pre-Designed Single-Molecule Traps for CO₂ Selective Adsorption. *Nature Communications*, **4**, 1-8. <https://doi.org/10.1038/ncomms2552>
- [13] Della Rocca, J., Liu, D. and Lin, W. (2011) Nanoscale Metal-Organic Frameworks for Biomedical Imaging and Drug Delivery. *Accounts of Chemical Research*, **44**, 957-968. <https://doi.org/10.1021/ar200028a>
- [14] Gangu, K.K., Maddila, S., Mukkamala, S.B. and Jonnalagadda, S.B. (2019) Characteristics of MOF, MWCNT and Graphene Containing Materials for Hydrogen Storage: A Review. *Journal of Energy Chemistry*, **30**, 132-144. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2018.04.012>
- [15] Giménez-Marqués, M., Hidalgo, T., Serre, C. and Horcajada, P. (2016) Nanostructured Metal-Organic Frameworks and Their Bio-Related Applications. *Coordination Chemistry Reviews*, **307**, 342-360. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.08.008>
- [16] Kuppler, R.J., Timmons, D.J., Fang, Q.-R., Li, J.-R., Makal, T.A., Young, M.D., Yuan, D., Zhao, D., Zhuang, W. and Zhou, H.-C. (2009) Potential Applications of Metal-Organic Frameworks. *Coordination Chemistry Reviews*, **253**, 3042-3066. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.05.019>
- [17] Sun, Y. and Zhou, H.C. (2015) Recent Progress in the Synthesis of Metal-Organic Frameworks. *Science and Technology of Advanced Materials*, **16**, Article No. 054202. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/5/054202>
- [18] Wang, C., Liu, D. and Lin, W. (2013) Metal-Organic Frameworks as a Tunable Platform for Designing Functional Molecular Materials. *Journal of the American Chemical Society*, **135**, 13222-13234. <https://doi.org/10.1021/ja308229p>

-
- [19] Fu, X., Yang, Z., Deng, T., Chen, J., Wen, Y., Fu, X., *et al.* (2020) A Natural Polysaccharide Mediated MOF-Based Ce6 Delivery System with Improved Biological Properties for Photodynamic Therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, **8**, 1481-1488. <https://doi.org/10.1039/C9TB02482D>
- [20] Gao, X., Cui, R., Ji, G. and Liu, Z. (2018) Size and Surface Controllable Metal-Organic Frameworks (MOFs) for Fluorescence Imaging and Cancer Therapy. *Nanoscale*, **10**, 6205-6211. <https://doi.org/10.1039/C7NR08892B>
- [21] Lin, K.Y.A., Liu, Y.T. and Chen, S.Y. (2016) Adsorption of Fluoride to UiO-66-NH₂ in Water: Stability, Kinetic, Isotherm and Thermodynamic Studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, **461**, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.08.061>
- [22] Zheng, D.W., Li, B., Li, C.X., Fan, J.X., Lei, Q., Li, C., Xu, Z. and Zhang, X.Z. (2016) Carbon-Dot-Decorated Carbon Nitride Nanoparticles for Enhanced Photodynamic Therapy against Hypoxic Tumor via Water Splitting. *ACS Nano*, **10**, 8715-8722. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b04156>
- [23] Chen, Y., Lin, H., Tong, R., An, N. and Qu, F. (2017) Near-Infrared Light-Mediated DOX-UCNPs@mHTiO₂ Nanocomposite for Chemo/Photodynamic Therapy and Imaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **154**, 429-437. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.026>