

ICG/PDA纳米粒的合成及其光热 - 光动力协同抑癌效应

刘旭, 徐娜, 蒲曦鸣, 尹光福*

四川大学生物医学工程学院, 四川 成都
Email: *yingf@scu.edu.cn

收稿日期: 2021年7月28日; 录用日期: 2021年8月10日; 发布日期: 2021年8月17日

摘要

在肿瘤治疗领域中, 纳米载药体系的研究与开发对于提高肿瘤治疗的精准度和有效性具有非常重要的意义, 但材料本身存在的生物相容性、肿瘤的异质性和复杂性以及可见光波段光源穿透深度不够等问题始终限制着肿瘤治疗效果的提高。本研究在聚多巴胺聚合过程中加入吲哚菁绿, 通过 π - π 堆积和疏水相互作用实现ICG的装载, 制备出可用于光热/光动力联合治疗的纳米载药体系。结果表明, 所制备的ICG/PDA材料具有较好的光热转换能力和光热稳定性, 在功率密度为 1 W/cm^2 的光照下, 溶液温度能够在1 min内迅速上升至 50°C , 此外, ICG/PDA较ICG有更快的活性氧产生速度和更多的活性氧产量。人卵巢癌细胞SKOV3细胞实验结果表明, 所制备的ICG/PDA材料在未光照的条件下具有较高的生物相容性, 而在 808 nm 近红外光照下具有明显的光照抑制作用。综上所述, 所制备的肿瘤抑制性ICG/PDA纳米复合材料具有用于肿瘤光热/光动力联合治疗的潜力。

关键词

聚多巴胺, 吲哚菁绿, 光热治疗, 光动力治疗, 联合治疗

Synthesis of ICG/PDA Nanoparticles and Their Photothermal-Photodynamic Synergistic Antitumor Effect

Xu Liu, Na Xu, Ximing Pu, Guangfu Yin*

College of Biomedical Engineering, Sichuan University, Chengdu Sichuan
Email: *yingf@scu.edu.cn

Received: Jul. 28th, 2021; accepted: Aug. 10th, 2021; published: Aug. 17th, 2021

*通讯作者。

Abstract

In the field of tumor therapy, the research and development of nano-drug delivery systems are of great significance to improve the accuracy and effectiveness of tumor therapy, but the biocompatibility of the material itself, the heterogeneity and complexity of tumors, and visible light problems such as insufficient penetration depth of the band light source have always limited the improvement of tumor treatment effects. In this study, indocyanine green was introduced in the process of polydopamine polymerization, and ICG was loaded through π - π stacking and hydrophobic interaction to prepare a nano-drug loading system that can be used for photothermal/photodynamic combined therapy. The results showed that the prepared ICG/PDA nanoparticles had good photothermal conversion ability and photothermal stability with a temperature rise to 50°C in 1 min under the irradiation of 1 W/cm² NIR, meanwhile, a faster active oxygen generation rate and more active oxygen production were exhibited than those by free ICG. Finally, the experimental results of human ovarian cancer cells (SKOV3) showed that the prepared ICG/PDA material possessed the excellent biocompatibility under condition without NIR irradiation, and exhibited the obvious tumor cell inhibition under 808 nm NIR irradiation. In summary, the prepared tumor inhibitory ICG/PDA nanoparticles have the potential to be used in photothermal/photodynamic combined therapy.

Keywords

Polydopamine, Indocyanine Green, Photothermal Therapy, Photodynamic Therapy, Combination Therapy

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. 绪论

纳米技术的快速发展为肿瘤的诊疗带来了新机遇[1]。纳米结构的形成不仅能够通过 EPR 效应靶向肿瘤组织,增加肿瘤细胞的内吞,还能有效降低药物的肾清除率(长效驻留率)。近年来,各种各样的纳米载药体系被提出并进行了实验研究,都展现出了优越的治疗性[2] [3] [4]。为了减轻药物带来的全身毒副作用,降低耐药可能性,解决药物降解与清除,人们研发了多种可以向肿瘤区域进行有效递送并控制释放的抗癌药物纳米载体[5] [6]。但制备纳米载药体系所用材料本身存在的生物相容性、生物安全性等问题需要始终限制着载药体系的研究和发展[7] [8] [9] [10]。

作为治疗癌症的两种最常见的光疗方法,光热疗法和光动力疗法推动着纳米载药体系的不断发展。近来,许多光热材料[11] [12] (例如贵金属材料,过渡金属硫氧化物,碳材料和上转换纳米材料)和光动力材料[13] [14] (例如酞菁氰,卟啉和其他染料分子)已用于光热疗法(Photothermal therapy, PTT)和光动力疗法(Photodynamic therapy, PDT)。无机纳米材料是早期用于研究光热/光动力联合治疗的材料,如碳纳米管,其具有高纵横比、超轻重量、高机械强度、高导电性和高导热性,可用于癌症的热消融、诊断和药物输送,然而,无机纳米材料分散性差,容易引起免疫反应限制了其临床应用[15]。卟啉类和卟啉衍生物类光敏剂是最早开发也是最早上市的肿瘤光动力治疗药物[16]。然而,刺激卟啉而发挥作用的可见光(VIS)难以穿透组织到达深部肿瘤组织,只能用于治疗皮肤或浅层组织。700~1100 nm 的近红外光照辐射

(Near-infrared light radiation, NIR)为大多数生物分子的吸收窗口,可以穿透深层组织,在肿瘤 PTT 和 PDT 中具有广阔的应用前景[17] [18]。

近年来,基于共轭聚合物的有机近红外吸收材料研究的发展,为探索强近红外吸收和高光热转换效率且无生物毒性的光热转换材料提供了新的思路[19] [20]。此外,有研究表明随着作用光谱的红移,PDT 的杀伤深度有趋于增大的变化。在治疗窗口内(近红外)辐射可能是刺激光敏剂在更深层组织进行光动力治疗的有效方法,因此,研究开发基于近红外波长吸收光敏剂的高效 PDT 药物治疗体系十分有必要。

本研究针对纳米载药体系存在的生物相容性的问题以及光动力治疗中穿透深度不够的问题,采用具有强近红外吸收、高光热转换效率以及无生物毒性的聚多巴胺(Polydopamine, PDA)为光热剂与药物载体,具有近红外吸收、高活性氧产量的吲哚菁绿(Indocyanine green, ICG)为光敏剂和被载药物,通过水热法制备用于光热/光动力联合治疗的 ICG/PDA 复合纳米载药体系。该方法基于 PDA 大量的离域 π 电子,将芳香分子 ICG 通过 π - π 堆积和疏水相互作用实现 ICG 的有效装载,旨在解决材料生物相容性的同时,利用简单一步法构建结构简单、单一刺激因素控制的复合近红外光照控释系统。

2. 材料和方法

2.1. 材料和试剂

以吲哚菁绿 ICG 和盐酸多巴胺 DA 为主要原料,采用一步法制备材料 ICG/PDA,通过人卵巢癌细胞试验,对材料的治疗性能进行测试与表征。实验所用原料试剂如表 1 所示,仪器设备如表 2 所示,细胞如表 3 所示。

Table 1. Experimental reagents and raw materials

表 1. 实验用试剂与原料

试剂名称	规格	生产商
吲哚菁绿(ICG)	99.9%	北京百灵威科技有限公司
盐酸多巴胺(DA·HCl)	A.R.	默克 Sigma-Aldrich 贸易有限公司
Tris	99.9%	德国 Biofroxx 上海桥星贸易有限公司
4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)	生物级	美国 Sigma 公司
培养基(DMEM)	生物级	美国 Gibico 公司
胎牛血清(FBS)	生物级	美国 Amresco 公司
胰蛋白酶粉(Try)	生物级	美国 Hyclone 公司
DCFH-DA (C ₂₄ H ₁₆ Cl ₂ O ₇)	生物级	北京索莱宝科技有限公司
Alamar Blue 细胞增殖与毒性检测试剂盒	生物级	上海生物科技公司
聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)	A.R.	美国 Invitrogen 公司
钙黄绿素/碘化丙啉细胞活死双染试剂盒	生物级	江苏凯基生物技术有限公司

Table 2. Experimental instruments and equipment

表 2. 实验用仪器与设备

仪器名称	仪器型号	制造商
FLIR E 系列红外热像仪	E8-XT	美国 FLIR 公司
傅里叶变换红外光谱仪	FTIR6700	美国尼高力仪器公司
紫外-可见分光光度计	U-3010	日本 JASCO 公司
激光粒度仪	3000 HSA	英国马尔文仪器有限公司

Continued

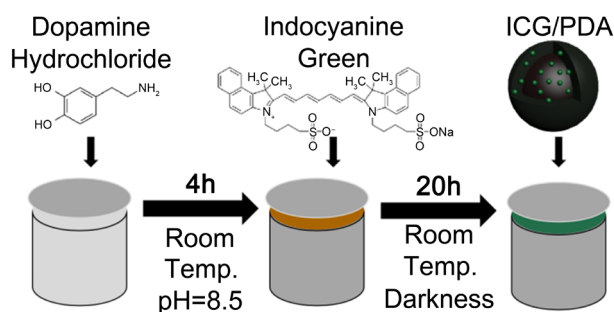
扫描电子显微镜	S-4800	日本 HITACHI 公司
808 nm 近红外激光辐照仪	FC-808-4W-MM	南京福鑫医疗科技有限公司
接触式数字测温仪	UT325	优利德科技股份有限公司
恒温细胞培养箱	DGG-9070B	上海森信实验仪器有限公司
荧光倒置显微镜	IX-71	日本 Olympus 公司
激光共聚焦显微镜	Stellaris 8	德国徕卡(Leica)公司

Table 3. Cells used in the experiment**表 3.** 实验用的细胞

细胞名称	种类	来源
人脐静脉血管内皮细胞株	HUVECs	四川大学移植工程与移植免疫(卫生部)重点实验室
人卵巢癌细胞株	SKOV3	国家生物材料工程技术研究中心(四川大学)

2.2. 材料制备与合成

以盐酸多巴胺及吲哚菁绿为原料, 水热法制备 ICG/PDA 纳米复合体系。1) 氧化自聚合制备 PDA 纳米粒: 称取 100 mg 盐酸多巴胺, 溶于 100 mL Tris 缓冲液(10 mM), 室温下磁性搅拌反应 24 h, 11,000 r/min 速度离心 5 min, 收集产物, 去离子水洗涤三遍后备用。2) 水热法制备 ICG/PDA 纳米粒: 盐酸多巴胺(100 mg)溶于 100 mL Tris 缓冲溶液(10 mM), 室温下搅拌 4 h 后, 称取 10 mg ICG 溶于 2 mL 去离子水, 逐滴加入到上述反应溶液中。室温下继续反应 20 h, ICG 在 PDA 的后续聚合过程中通过 π - π 堆积和疏水作用装载到 PDA 纳米微球内部。反应结束后, 离心(11,000 r/min, 5 min)收集产物 ICG/PDA NPs, 并用去离子水洗涤一次后备用, 如图 1 所示。

**Figure 1.** Schematic diagram of the preparation of ICG/PDA nanoparticles**图 1.** ICG/PDA 纳米粒的制备原理图

2.3. 材料组成与结构表征

通过扫描电子显微镜(SEM)进行纳米颗粒的形貌分析。通过动态光扫描(DLS)分析表征了 PDA、ICG/PDA NPs 的流体动力学直径(DH)和 zeta 电位(ζ)。用傅立叶变换红外(FT-IR)光谱仪对 DA 和 PDA 进行结构鉴定。通过紫外分光光度计测得 ICG、PDA 和 ICG/PDA 等材料的紫外-可见吸收光谱, 分析测得合成材料的特征吸收峰位置是否出现红移, 鉴定材料是否成功负载 ICG。

2.4. 材料理化性能测试

光热转换与循环稳定性测试: 在功率密度为 1 W/cm^2 的近红外激光照射下, 对 ICG、PDA 和 ICG/PDA

材料($C_{ICG} = 10 \mu\text{g/mL}$)进行了光热转换性能和 5 次光热循环稳定性测试, 并利用近红外照相机拍摄热成像照片、数字测温仪进行温度变化曲线记录。

活性氧产量测试: 200 μg ICG/PDA 溶于 2 mL 1:1000 培养基配置的 DCFH-DA 溶液制备浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的材料/DCFH-DA 分散液。将 10 μg 的 ICG 充分溶解于 2 mL 的用培养基按照 1:1000 配置好的 DCFH-DA 溶液中制备浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 ICG/DCFH-DA 分散液。在功率密度 1 W/cm^2 的近红外激光辐照下, 分别对上述分散液进行时长 60 min 的光照辐射, 每间隔 10 min 取 100 μL 分散液用培养基稀释至 2 mL, 通过混合液的荧光发射曲线在 520 nm 左右吸收峰的上升速度, 比较不同材料活性氧产生速度, 通过混合液荧光发射曲线在 520 nm 处上升幅度比较不同材料活性氧产生量。

2.5. 细胞试验研究

采用 HUVECs 和 SKOV3 进行体外生物学行为研究。材料的生物相容性通过细胞毒性试验表征, 采用 CCK-8 测定了不同浓度材料作用下的细胞活性。通过对与 ICG/PDA 材料共孵育 2 h 的细胞进行了时长为 10 min 的近红外激光辐照(1 W/cm^2), 在激光共聚焦下观察了材料入胞的情况。

胞内活性氧产效实验通过将材料和 DCFH-DA 先后与细胞共孵育 2 h 和 30 min 后, 在功率密度 1 W/cm^2 的近红外激光下进行 10 min 的光照, 荧光倒置显微镜下观察绿色荧光的强度进行评价。

通过体外细胞药物疗效试验验证本研究制备材料 ICG/PDA 的治疗效果, 将接板的细胞, 随机分 A、B 两组, A 为光照组、B 为非光照组。接板过夜后吸弃培养基, 加入完全培养基稀释的药物孵育 2 h (设置 control, 每个样至少三组平行实验)后取出, 非光照组与光照组至于同一环境条件下, 将光照组在 808 nm 激光辐射下光照 10 min/孔, 能量密度为 2.2 W/cm^2 , 随后所有孔用 PBS 轻柔润洗 2 次, 避免冲洗掉死亡细胞。Calcein-AM/PI 双染试剂盒对药物作用后的细胞进行活死染色 10~30 min, 除去染液后, 荧光显微镜下观察荧光, 并拍照记录。

2.6. 数据处理与统计

所有试验数据均通过归一化处理。数据采用 SPSS 24.0 统计软件进行分析数据均数及标准差, 组间比较采用单因素方差分析, P 值 < 0.05 为有统计学意义, 柱状图由 Origin Pro 9.1 软件绘制。

3. 结果与讨论

3.1. 材料的组成与结构

纳米复合材料的形貌、粒径和荷电性是决定载药系统是否能够以稳定的形态通过循环聚集到肿瘤组织区域、实现靶向运载和协助胞吞的关键。因此, 利用 DLS 和 SEM 观察了所制备材料的形貌、粒径分布以及材料荷电情况。所制备 PDA, ICG/PDA NPs 的组成与结构表征结果如图 2 所示。

SEM 结果表明, PDA 与 ICG/PDA 纳米材料的形态完整均匀, 均是单分散状态微球(图 2(a), 图 2(b), 图 2(d), 图 2(e)), 这有利于材料实现胞吞。PDA NPs 和 ICG/PDA NPs 的最终的平均水合粒径分别为 222 nm, 226 nm (图 2(f)), 与 SEM 结果一致。ICG/PDA NPs 的 ζ 电位较 PDA NPs 呈现负向增加, 侧面说明 ICG 实现了成功装载(图 2(c))。

图 2(g)是 DA·HCl 与 PDA 的 UV-vis 吸收光谱对比图, 在 DA 聚合形成 PDA 后不仅在溶液颜色上发生了明显的改变, 从无色透明的 DA 溶液变成了深棕色的 PDA 溶液, 也在 UV-vis 光吸收上实现了从无到有的变化。从图中可知深棕色的聚多巴胺在紫外到近红外的波长范围内有宽频段的单调吸收。如图 2(h)所示, 图中红色曲线和蓝色曲线分别代表了冻干处理后的 PDA NPs 和 DA·HCl 粉末的红外光谱图。与 DA·HCl 相比, PDA 在 $1300\sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 指纹区的吸收峰精细性较差。众所周知, 指纹区对分子结构的变化高度敏感, 由此可推测出 DA·HCl 分子结构在聚合形成 PDA 过程中发生了结构性的变化, 黑色虚线标志

的 1520、1615 和 3420 cm^{-1} 处的吸收带分别对应了先按结构中的 N-H、芳环上的 C-H 和儿茶酚基团中的 -OH 的剪切振动, 这些特征吸收带的明显变化也在结构变化上证明了 PDA 生成。

UV-vis 吸收曲线显示, 复合后的 ICG/PDA 材料较 ICG 的特征吸收峰明显红移, 这是由于当 ICG 分子吸附到正在聚合的 PDA 纳米颗粒表面后, 相互接触的 ICG 分子通过离域电子的传导致使材料吸收峰发生红移, 说明 PDA 的大量离域 π 电子与芳香分子 ICG 之间发生了 π - π 共轭, 实现了 ICG 的成功装载(图 2(i)), 通过 UV-vis 测得的吸光度与材料浓度的对应关系, 对 ICG/PDA 复合纳米材料进行载药量计算, 最终算的 ICG/PDA 材料的 ICG 装载率达到了 4%, 封装效率约 69%。

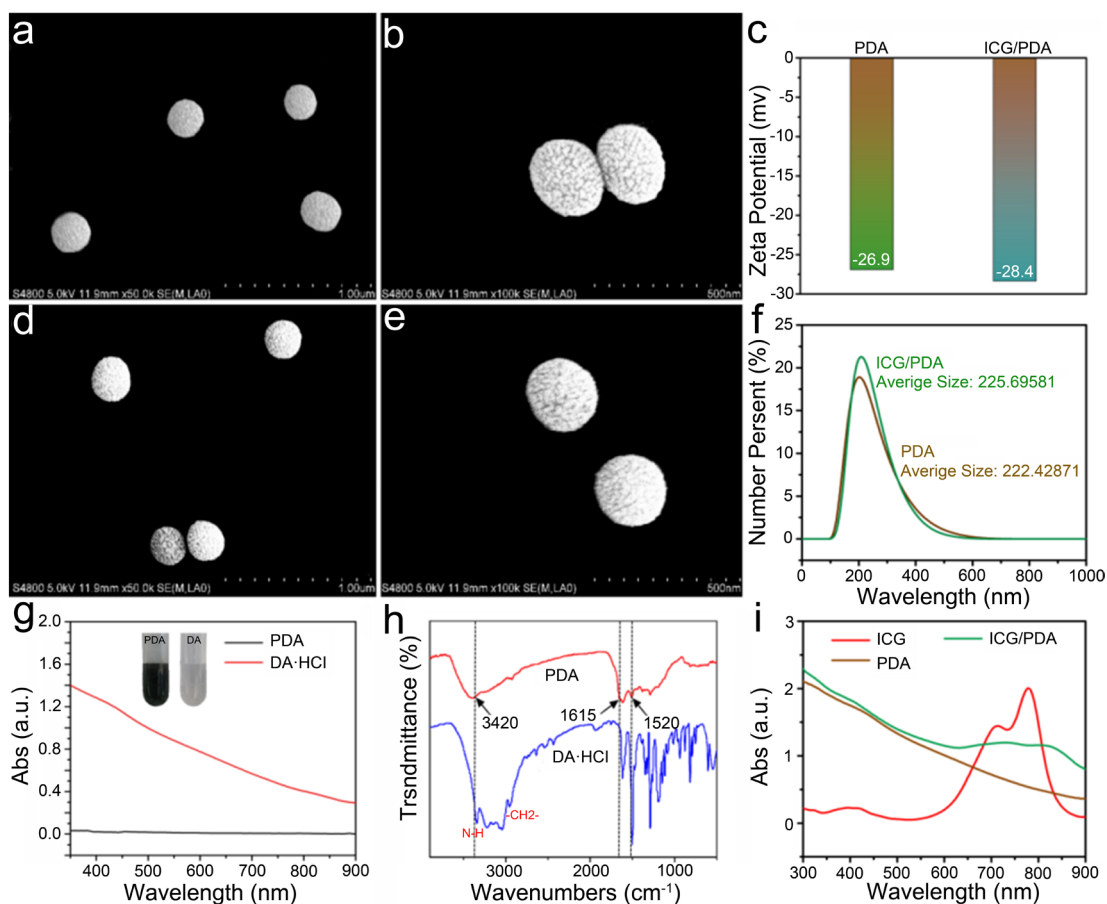


Figure 2. Composition and structure characterization results. (a, b) SEM images of PDA; (d, e) SEM images of ICG/PDA; (c) Zeta potential; (f) Hydrated particle size; (g) PDA and DA UV-vis absorption curve comparison chart; (h) Fourier infrared (FT-IR) curve of PDA and DA; (i) UV-vis absorption curve comparison chart of ICG/PDA system

图 2. 组成与结构表征结果图。(a, b) PDA 的 SEM 图; (d, e) ICG/PDA 的 SEM 图; (c) zeta 电位; (f) 水合粒径; (g) PDA 与 DA 的 UV-vis 吸收曲线比较图; (h) PDA 与 DA 的傅里叶红外(FT-IR)曲线; (i) ICG/PDA 体系的 UV-vis 吸收曲线比较图

PDA 复杂的连接方式决定了 PDA 对光的吸收在一定波长范围内呈现出连续性, 结构的变化也赋予了 PDA 在近红外光照辐射下可实现光吸收与光热转换, 其过程可描述为 PDA 分子的价电子吸收近红外光子能量后发生量子化的能级跃迁, 而 PDA 独特的聚合方式所形成的分子内与分子间氢键与 π - π 堆叠决定了 PDA 分子的激发价电子以热的形式释放能量发生非辐射衰减来实现 PDA 的光热转换, 而这种非辐射衰减的方式决定了激发态电子不经过发射荧光, 而是通过猝灭或能量转移的方式回到基态, 这种能量转移形式能够解决光热剂与光敏剂协同治疗过程中吸收不匹配或能量转移、复杂的共轭化学等问题。因

此, 理论上 PDA 独特结构决定其能够在与光敏剂 ICG 共同制备合成的光热/光动力协同治疗体系能够实现合适能量吸收匹配与转移, 并猝灭 ICG 的荧光, 保证 ICG 在体系内的稳定性, 从而达到提高了 ICG 的单线态氧产率的目的。与此同时, ICG 装载到纳米颗粒表面之后, 与周围的水/氧分子之间接触减少, 相互作用减弱, 有利于降低光漂白作用, 并且其分散性增加, 阻止了 ICG 分子间的进一步聚集, 解决了 ICG 单独存在时所具有的浓度聚集性以及 ICG 单独存在时更容易出现光漂白现象的问题, 这也从理论上证明了后续材料体外光热转换实验结果。

3.2. 光热转换与活性氧产生

本研究制备的 ICG/PDA 体系是用于光热/光动力联合治疗的纳米载药体系, 因此, 我们采用近红外照相机和 UT325 接触式数字测温仪测试了不同材料光热转换能力以及光热循环稳定性, 以此来评估所制备的 ICG/PDA 材料是否具备光热治疗的能力。此外, 我们通过 DCFH-DA 对材料产生活性氧的速度和最终产量进行测试, 以评估所制备 ICG/PDA 材料是否具备光动力治疗的能力。我们按照图 3(b)所示方法对材料进行了近红外光照辐射并测试, 结果如图 3 所示。

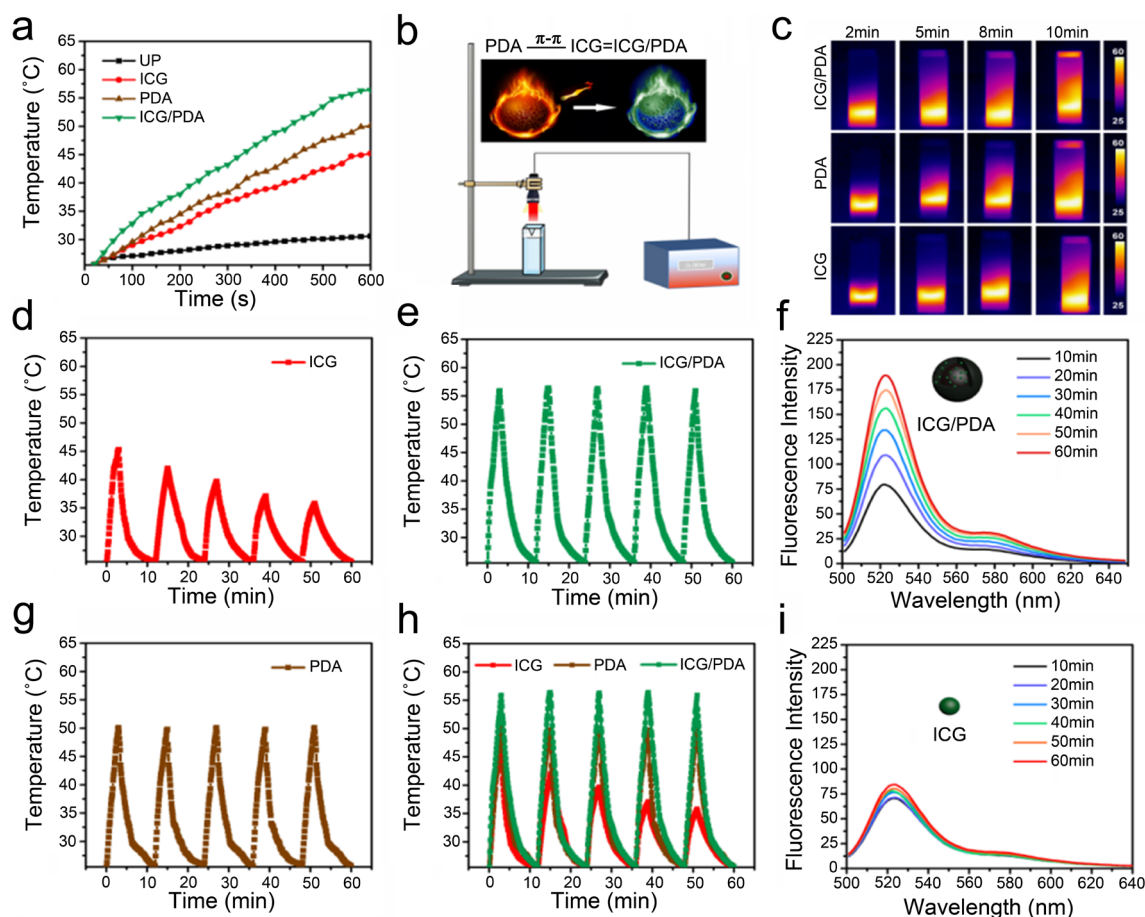


Figure 3. Results of material performance characterization. (a) ICG/PDA system photothermal conversion absorption curve comparison diagram; (b) illumination test schematic diagram; (c) photothermal conversion principle diagram; (d) ICG; (e) ICG/PDA and (g) PDA light Thermal cycle curve; (h) ICG/PDA system photothermal cycle stability comparison diagram; (f) ICG/PDA active oxygen test result diagram; (i) ICG active oxygen test result diagram

图 3. 材料性能表征结果图。(a) ICG/PDA 体系光热转换吸收曲线比较图; (b) 光照试验示意图; (c) 光热转换原理图; (d) ICG; (e) ICG/PDA 与 (g) PDA 的光热循环曲线; (h) ICG/PDA 体系的光热循环稳定性比较图; (f) ICG/PDA 的活性氧测试结果图; (i) ICG 的活性氧测试结果图

从图 3(a), 图 3(c)可直观地发现, 在相同 PDA 浓度和光照条件下, 不同材料温度随时间上升, 且上升速度呈现为 ICG/PDA > PDA > ICG > UP 水, 充分说明了所制备的 ICG/PDA 材料较 ICG 和 PDA 具有更好的光热转换效果, 材料分散溶液温度能够在光照 10 min 后升高约 31.5℃, 此外, ICG/PDA 材料在光照下温度上升速度较 ICG 和 PDA 更快。

图 3(d), 图 3(e), 图 3(g)分别是 ICG、ICG/PDA、PDA 的光热循环温度变化曲线, 图 3(h)是 ICG/PDA 体系的光热循环温度变化比较图, 结果表明, ICG/PDA 和 PDA 具有较好的光热循环稳定性, 而 ICG 在近红外光照辐射下温度上升幅度逐渐减小, 这说明与 PDA 复合形成 ICG/PDA 复合纳米材料之后, 实现了光照循环的稳定, 避免了 ICG 光照漂白失效的发生。

图 3(f), 图 3(i)分别是用 DCFH-DA 溶液分散的 ICG/PDA 和 ICG 在 1 W/cm² 的近红外光照辐射下照射 10、20、30、40、50、60 min 后的荧光发射曲线。上升幅度越高, 说明产生活性氧越多, 曲线斜率越大, 说明活性氧产生速度越快。结果表明, 随着照射的进行, 材料的活性氧产量逐渐增加, 且 ICG/PDA 的活性氧产生速度较 ICG 更快, 在最终试验结束时活性氧终产量较 ICG 更多。

3.3. 细胞毒性与抑癌效应

材料的生物相容性决定了材料是否能够应用于人体, 因此, 生物安全性与生物相容性是生物医学材料在临床应用中必需高度关注的性能, 也是评价所有肿瘤纳米载药体系的重要环节。在本节中, 对制备的复合纳米材料的细胞毒性、细胞内化以及光照毒性抑制等进行评价。ICG/PDA 材料对人脐静脉内皮细胞 HUVECs 的细胞毒性, 结果如图 4(a), 图 4(b)所示。

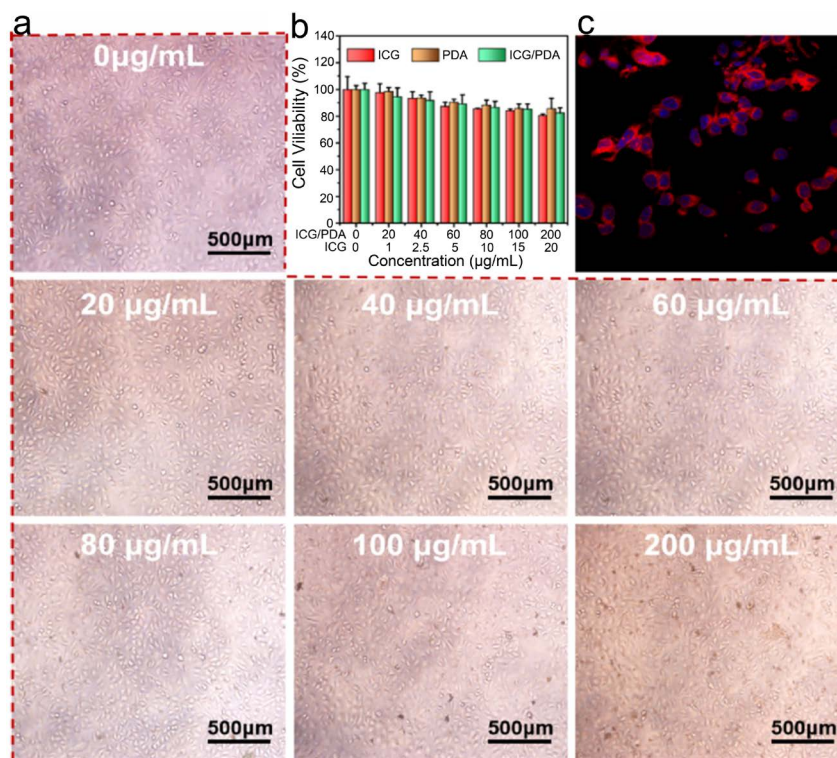


Figure 4. Cytotoxicity and internalization results of ICG/PDA materials. (a) Cell morphology of HUVECs after 24 hours of co-cultivation with ICG/PDA materials; (b) HUVECs cytotoxicity quantitative chart; (c) SKOV3 cell internalization result
图 4. ICG/PDA 材料的细胞毒性和内化结果图。(a) 与 ICG/PDA 材料共培养 24 h 后 HUVECs 形态图; (b) HUVECs 细胞毒性定量图; (c) SKOV3 细胞内化结果图

图 4(a)结果表明, 材料对 HUVECs 细胞的细胞数量与细胞生长状态都没有较显著的影响, 仅在高浓度材料共孵育条件下有极少数细胞呈圆缩、疏松贴壁, 但无胞浆内颗粒或显示形态学方面的改变, 能够观察到轻微的细胞生长抑制现象, 没达到细胞毒性的标准。如图 4(b)所示, 随着材料浓度的上升, 不同材料组细胞存活率均 $> 80\%$, 说明本实验制备的材料均具有较好的细胞生物相容性($c \leq 200 \mu\text{g/mL}$)。

图 4(c)是 SKOV3 细胞与浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ 的 ICG/PDA 共培养 2 h 后, 在功率密度为 1 W/cm^2 的近红外光照下材料内化的结果图, 红色的荧光是 ICG 通过能量转换发射出的荧光, 蓝色的荧光是核定位染料 DAPI 的荧光, 结果表明, ICG/PDA 能够有效进入细胞内部, 此外, 在近红外光照下, ICG/PDA 能够解离开来, 并释放 ICG 分子, 解离下来的 ICG 不仅在细胞质内扩散, 还能够进入细胞核内, 有利于进一步的治疗开展。

为了进一步测试材料入胞后活性氧产效, 本研究采用 DCFH-DA 试剂盒对细胞进行了活性氧测试。将含相同 ICG 浓度($10 \mu\text{g/mL}$)的不同材料溶液分别与不同细胞共培养后进行光照辐射, 通过在倒置荧光显微镜下拍取 SKOV3 细胞荧光照片对材料经过近红外光照后在胞内产生的活性氧量进行评价与分析, 结果如图 5 所示。

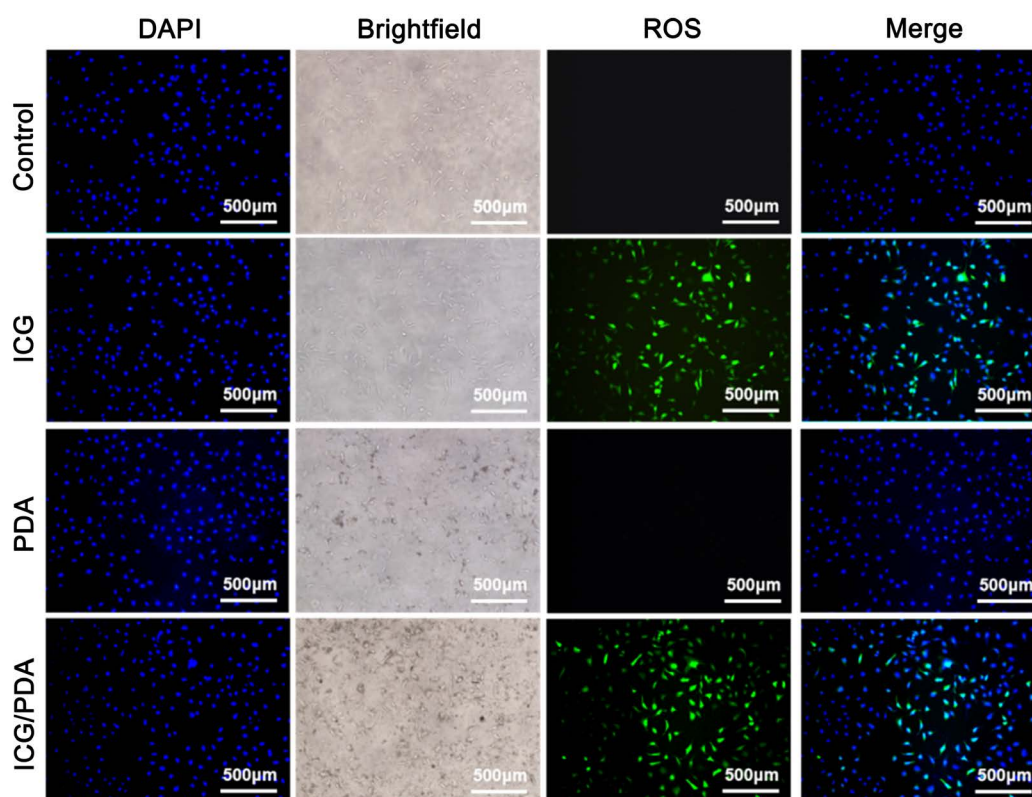


Figure 5. Test results of the production of reactive oxygen species in the cells

图 5. 材料在细胞内活性氧生产测试结果图

图示蓝色荧光是核定位染料 DAPI 的荧光, 绿色荧光是 DCFH-DA 试剂被材料产生的活性氧所氧化, 形成了绿色荧光物质, 荧光越强说明产生的活性氧越多。Control 组和 PDA 组的细胞未出现显著绿色荧光, 说明细胞本身和 PDA 材料无活性氧产生, 而在与含有 ICG 的材料共孵育后的细胞组光照后均出现了绿色荧光, 说明活性氧是 ICG 在近红外光照条件下产生的, 且合成的 ICG/PDA 材料具有较好的活性氧产生量。

最后，我们通过 Calcein-AM/PI 细胞活死染色定性评价了 ICG/PDA 材料对细胞的光毒抑制作用。通过控制激光照射距离和输出功率，获得激光功率密度为 2.2 W/cm^2 、辐照圆圈直径为 1 cm 的光照条件。将前一天用 6 孔板接板的细胞与含有 ICG 浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 的 ICG/PDA 材料共孵育 2 h 后，将激光光斑中心调节至与 6 孔板($d = 3 \text{ cm}$)中心重叠后进行时长 10 min 的近红外激光辐照。

图 6 是 SKOV3 细胞的未光照区域、光照过渡区域和光照辐射区域细胞活死染色图，绿色是 Calcein-AM 染料染色的活细胞，红色是 PI 染料染色的死细胞，染色不明显的细胞可能存在凋亡趋势。Calcein-AM/PI 细胞活死染色图结果表明，没有光照的部分细胞边缘清晰且形态饱满，核质分明；而进行了光照部分的细胞周围材料沉积显著且细胞扁平而破碎，核质不清；过渡区域由于处于能量边界区域，出现了活细胞死细胞共存的现象。结果表明光热 - 光动力协同治疗具有高选择性，同时也提示临床选择合适的光照辐射区域与激光辐照强度是实现肿瘤根治的必要条件。

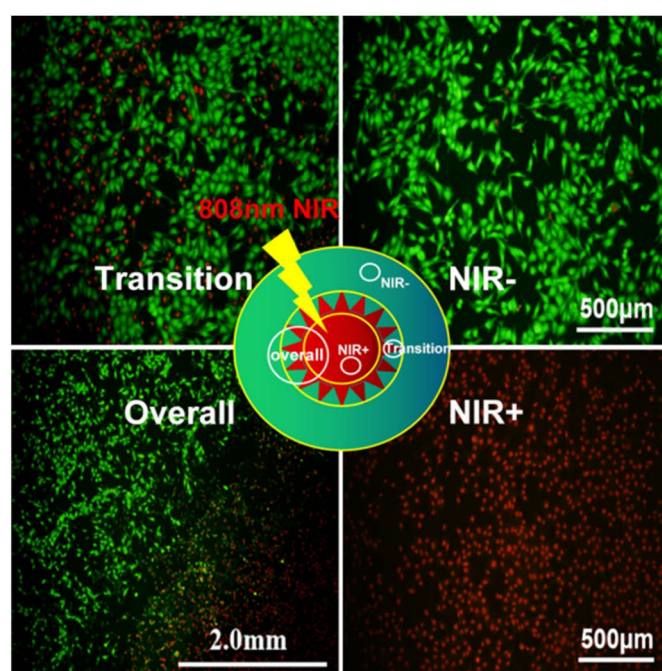


Figure 6. Test results of the phototoxicity inhibition effect of materials on cells
图 6. 材料对细胞的光毒抑制作用测试结果图

4. 结论

综上所述，本研究采用一步法制备 ICG/PDA 复合纳米材料，制备条件温和，过程简单。ICG/PDA 复合纳米粒较游离 ICG 具有更好的光热循环稳定性，有较高的载药量和灵敏的近红外响应性药物控制释放性能，一定程度解决光热剂与光敏剂协同治疗过程中吸收不匹配或能量转移、复杂的共轭化学等问题，因此 ICG/PDA 纳米材料体系能够实现有效的能量利用。所制备的 ICG/PDA 纳米复合材料较 PDA 和 ICG 有更高的光热转换效果，升温速度更快，活性氧产生速度更快，活性氧产量更高。ICG/PDA 纳米复合材料具有较高的生物相容性，能够有效的被细胞摄取，在近红外光照下，能够实现优异的光照抑制毒性。因此，本研究所制备的 ICG/PDA 复合纳米材料具有了在近红外响应性下实现多模式联合治疗肿瘤的较大潜力，为后续在近红外响应性下实现多模式协同靶向治疗肿瘤的光热 - 光动力协同治疗体系研究提供了指导和借鉴。

参考文献

- [1] Li, J., Yao, M., Shao, Y., *et al.* (2018) The Application of Bio-Nanotechnology in Tumor Diagnosis and Treatment: A View. *Nanotechnology Reviews*, **7**, 257-266. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2018-0011>
- [2] Liu, Y., Yang, G., Jin, S., *et al.* (2020) Development of High-Drug-Loading Nanoparticles. *ChemPlusChem*, **85**, 2143-2157. <https://doi.org/10.1002/cplu.202000496>
- [3] Lee, S.H., Park, O.K., Kim, J., *et al.* (2019) Deep Tumor Penetration of Drug-Loaded Nanoparticles by Click Reaction-Assisted Immune Cell Targeting Strategy. *Journal of the American Chemical Society*, **141**, 13829-13840. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b04621>
- [4] Li, X., Salzano, G., Qiu, J., *et al.* (2020) Drug-Loaded Lipid-Coated Hybrid Organic-Inorganic “Stealth” Nanoparticles for Cancer Therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **8**, 1027. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.01027>
- [5] Sathya, S., Lim, Y.T., Parthasarathi, S., *et al.* (2021) Fabrication of Drug-Loaded Calcium Phosphate Nanoparticles: An Investigation of Microbial Toxicity. *Journal of Cluster Science*. <https://doi.org/10.1007/s10876-021-02104-6>
- [6] Lu, Y., Jia, D., Ma, X., *et al.* (2021) Reduction-Responsive Chemo-Capsule-Based Prodrug Nanogel for Synergistic Treatment of Tumor Chemotherapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **13**, 8940-8951. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c21710>
- [7] Sun, W., *et al.* (2018) Biodegradable Drug-Loaded Hydroxyapatite Nanotherapeutic Agent for Targeted Drug Release in Tumors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **10**, 7832-7840. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b19281>
- [8] Syama, S. and Mohanan, P.V. (2016) Safety and Biocompatibility of Graphene: A New Generation Nanomaterial for Biomedical Application. *International Journal of Biological Macromolecules*, **86**, 546-555. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.116>
- [9] Mittal, A.K. and Banerjee, U.C. (2021) *In Vivo* Safety, Toxicity, Biocompatibility and Anti-Tumour Efficacy of Bio-inspired Silver and Selenium Nanoparticles. *Materials Today Communications*, **26**, Article ID: 102001. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.102001>
- [10] Witika, B.A., Makoni, P.A., Matafwali, S.K., *et al.* (2020) Biocompatibility of Biomaterials for Nanoencapsulation: Current Approaches. *Nanomaterials*, **10**, 1649. <https://doi.org/10.3390/nano10091649>
- [11] Xiao, L., Chen, X., Yang, X., *et al.* (2020) Recent Advances in Polymer-Based Photothermal Materials for Biological Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2**, 4273-4288. <https://doi.org/10.1021/acsapm.0c00711>
- [12] Yang, Z., Sun, Z., Ren, Y., *et al.* (2019) Advances in Nanomaterials for Use in Photothermal and Photodynamic Therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*, **20**, 5-15. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10218>
- [13] Lu, D., Tao, R. and Wang, Z. (2019) Carbon-Based Materials for Photodynamic Therapy: A Mini-Review. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, **13**, 310-323. <https://doi.org/10.1007/s11705-018-1750-7>
- [14] Chen, J.M., *et al.* (2020) Advances in Nanomaterials for Photodynamic Therapy Applications: Status and Challenges. *Biomaterials*, **237**, Article ID: 119827. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119827>
- [15] Krajczewski, J., Rucinska, K., Townley, H.E., *et al.* (2019) Role of Various Nanoparticles in Photodynamic Therapy and Detection Methods of Singlet Oxygen. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **26**, 162-178. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.03.016>
- [16] 唐建武, 朱逢春. 激光-血卟啉肿瘤光动力学疗法的生物医学机制[J]. 国外医学(肿瘤学分册), 1991(5): 268-270.
- [17] Xiong, H., Zhou, K., Yan, Y., *et al.* (2018) Tumor-Activated Water-Soluble Photosensitizers for Near-Infrared Photodynamic Cancer Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **10**, 16335-16343. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b04710>
- [18] Ding, S.H., Wu, W.B., Peng, T.T., *et al.* (2021) Near-Infrared Light Excited Photodynamic Anticancer Therapy Based on UCNP@AIEgen Nanocomposite. *Nanoscale Advances*, **3**, 2325-2333. <https://doi.org/10.1039/D0NA00985G>
- [19] Li, S., Wang, X., Rong, H., *et al.* (2016) Near-Infrared (NIR)-Absorbing Conjugated Polymer Dots as Highly Effective Photothermal Materials for *In Vivo* Cancer Therapy. *Chemistry of Materials*, **28**, 8669-8675. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b03738>
- [20] Wang, Y., Meng, H.M., Song, G., *et al.* (2020) Conjugated-Polymer-Based Nanomaterials for Photothermal Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2**, 4258-4272. <https://doi.org/10.1021/acsapm.0c00680>