

## 负载吲哚菁绿和多柔比星的温敏胶束在 MCF-7 肿瘤细胞治疗中的联合应用

宗玲, 袁安然, 朱耀, 顾云双, 戈延茹\*, 沈松\*

(江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

**摘要:** 本文利用无规共聚法制备温敏胶束, 通过物理吸附将光敏剂吲哚菁绿 (indocyanine, ICG) 负载在胶束上, 在近红外光照射后, 将光能转化为热能, 使温度升高, 达到相变温度后发生解聚, 从而实现特异性治疗。采用透射电镜、核磁共振波谱仪和傅立叶红外光谱仪等手段对胶束进行表征; 对多柔比星 (doxorubicin, DOX) 进行负载, 考察所制备载体的临界胶束浓度 (critical micelle concentration, CMC)、高临界溶解温度、光热性能及光控释药结果。此外, 对空白载体及载药载体的细胞摄取、体外毒性及光热、光热-化疗联合治疗的效果进行了研究。结果表明, 所制备的胶束  $p(\text{AAm-co-AN})\text{-}g\text{-PEG}$  (PAAP) 形状均一, 呈类球形, 粒径约 45 nm, 相变温度为 43 °C 左右, CMC 约为 24  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 负载 ICG 及 DOX 后 (DOX-ICG-PAAP), 胶束粒径增加至 88 nm, 且光热效果明显, 给予近红外光 (808 nm, 2  $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 2  $\text{min}\cdot\text{h}^{-1}$ ) 照射后, 5 h 药物累计释放率可增加到 59.4% (pH 5.0); 细胞实验结果显示, 空白载体 ICG-PAAP 无显著毒性, 可通过溶酶体途径摄取, 结合化疗后, 当 DOX 质量浓度为 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 照射 3 min 可杀伤 70% 以上的细胞。以上结果表明, 所制备的胶束具有温敏性且毒性较低, 在近红外光照射下, 可促进药物加快释放从而实现光热化疗联合抗肿瘤的效果。

**关键词:** 温敏胶束; 局部治疗; 光热治疗; 联合治疗

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 07-1169-08

## Preparation of thermo-responsive micelles loaded with indocyanine green and doxorubicin for combined therapy in MCF-7 cells

ZONG Ling, YUAN An-ran, ZHU Yao, GU Yun-shuang, GE Yan-ru\*, SHEN Song\*

(College of Pharmaceutical Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** In this study, the thermo-responsive micelles were synthesized with random copolymerization method and the photosensitizer indocyanine green (ICG) was loaded on micelles through the physical adsorption. The light energy was converted into heat energy to increase the temperature after irradiation with near-infrared light. When the phase transition temperature was reached, the micelle was disassembled and the targeted therapy was achieved. The nanoparticles were characterized with a transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectrometer, nuclear magnetic resonance spectrometer and other characterization were used to investigate. The critical micelle concentration (CMC), upper critical solution temperature, the photothermal properties of the carrier and the release of drug triggered by light were investigated after the doxorubicin (DOX) loaded. The carrier was evaluated for toxicity, cellular uptake, the effect of photothermal, the combination of photothermal and chemotherapy; the  $p(\text{AAm-co-AN})\text{-}g\text{-PEG}$  (PAAP) was spherical in shape with a particle size of about 45 nm

收稿日期: 2018-04-02; 修回日期: 2018-04-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503017); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20150534); 国家博士后基金资助项目 (15M580404).

\*通讯作者 Tel: 86-511-85038170, Fax: 86-511-85038451-806, E-mail: geyanru@ujs.edu.cn; jsdx.shensong@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0291

and a phase transition temperature was about 43 °C. The critical micelle concentration was 24  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The particle size increased to 88 nm after loaded with ICG and DOX which the photothermal effect was obvious. The cumulative release of the drug under the irradiation of near-infrared light (808 nm, 2  $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 2  $\text{min}\cdot\text{h}^{-1}$ ) was increased to 59.4% (pH 5.0) after 5 h. The results of the cell experiment indicated that ICG-PAAP was almost non-toxic and uptaken by the lysosomal pathway. The cell killing effect was stronger with combination of chemotherapy (DOX as 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) with more than 70% of the cells killed. The results showed that the prepared micelle with low toxicity was thermoresponsive and could be used in combined therapy of tumor under the irradiation of near-infrared light.

**Key words:** thermoresponsive micelles; local therapy; photothermal therapy; combined therapy

肿瘤的治疗普遍存在不良反应大、治疗效果不佳等问题,开展局部特异性治疗有助于降低毒性,提高疗效<sup>[1]</sup>。环境敏感型纳米载药系统<sup>[2]</sup>可对外界条件迅速响应,从而控制药物的释放速度和部位,达到局部治疗的效果。常见的响应因素包括 pH<sup>[3]</sup>、温度<sup>[4]</sup>、磁场<sup>[5]</sup>和超声波<sup>[6]</sup>等,其中,由于温度的变化易于操作,所以温敏纳米载药系统一直是研究的重点。温敏聚合物胶束是一种具有疏水性内核和亲水性外壳的纳米粒,可以作为许多疏水抗癌药物的载体,并可以在临界温度附近发生相变<sup>[7]</sup>,通过可逆性膨胀或收缩从而释放出药物。温敏胶束主要包括两大类:一种是基于低临界溶解温度 (low critical solution temperature, LCST),加热至相变温度时聚合物链由于去水合作用,由溶解状态变成不溶状态,发生收缩聚集,如聚(*N*-异丙基丙烯酰胺) (PNIPAM)<sup>[8]</sup>,但在水中的相变温度非常狭窄,接近 32 °C;另一种是基于高临界溶解温度 (upper critical solution temperature, UCST)<sup>[9]</sup>,加热至相变温度时由于水合作用使两亲性链段从不溶状态变成溶解状态,发生解聚<sup>[10]</sup>,目前研究较少,具有很好的研究前景。相比低临界溶解温度的聚合物胶束加热收缩,高临界溶解温度的胶束稳定性更高,释药更彻底,有利于增加目标位置的药物浓度,从而提高治疗效果,降低系统毒性<sup>[11]</sup>。

光热治疗 (photothermal therapy, PTT) 是近年来发展的一种微创性肿瘤技术,可以实现定点杀伤,极大地降低了系统毒性<sup>[12]</sup>。光热治疗主要利用近红外光激发光敏剂,使光能转化成热能来达到杀死肿瘤细胞的目的。光热治疗的一个重要因素就是光敏剂,常见光敏剂包括金纳米材料<sup>[13]</sup>、碳纳米材料<sup>[14]</sup>、铜基半导体材料<sup>[15]</sup>和吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG)<sup>[16]</sup>等。ICG 是目前唯一被美国 FDA 批准的近红外染料,生物相容性较好,光转化效率高<sup>[17]</sup>。本研究制备了一种负载 DOX 的 ICG-PAAP 两亲性聚合物温敏胶束,在近红外光的照射下,ICG 产生热量,并促

进 DOX 的释放,从而实现热疗与化疗的联合应用,避免了药物在传递过程中释放和毒副作用。

## 材料与方法

**试剂** 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、偶氮二异丁腈 (国药集团化学试剂有限公司); 单甲氧基聚乙二醇 (聚乙二醇单甲醚) 琥珀酰亚胺碳酸酯 [methoxypoly(ethylene glycol) succinimidyl este, mPEG-SC], 丙烯腈、丙烯酰胺、ICG、尼罗红 (阿拉丁试剂有限公司); 盐酸多柔比星 (doxorubicin hydrochloride, DOX·HCl, 北京华奉联博科技有限公司); 四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, Sigma-Aldrich 公司); DMEM 细胞培养基 (赛默飞世尔生物化学制品有限公司); 胚胎牛血清 (杭州四季青生物科技有限公司); 其他试剂均为分析纯,所有实验用水均为去离子超纯水。

**细胞** 人乳腺癌 MCF-7 细胞 (中国科学院上海生化与细胞研究所)。

**仪器** 紫外可见分光光度计 (UV-2450)、荧光分光光度计 (RF-5301PC) (日本岛津公司); 核磁共振波谱仪 (AC-80, 德国布鲁克公司); 傅立叶红外光谱仪 (FTIR-370, Nicolet Avatar, 美国 Nicolet Instrument Corporation 公司); 透射电子显微镜 (Tecnai 12, 荷兰 Philips 公司); 高分辨粒度分析仪 (90 Plus PALS, 美国 Brookhaven 公司); 高速冷冻离心机 (Allegra X-15, 美国 Beckmancoulter 公司); 红外热成像仪 [Testo 875-1i, 德图仪器国际贸易 (上海) 有限公司]; 可调 808 nm 光纤耦合激光器 (LDD 808-2000G3, 西安赫胥尔镭得激光科技有限公司); 冷冻干燥机 (LOC-1m, 德国 Christ 公司); 酶标仪 (Spectra max 190, 美国 MD 公司)。

**两亲性聚合物胶束 p(AAm-co-AN)-g-PEG 的制备** 采用无规共聚法制备两亲性聚合物胶束。预先将丙烯腈、DMSO 蒸馏以备使用。精密称取丙烯腈

2.65 g、丙烯酰胺 10.65 g, 量取 DMSO 167 mL, 通  $N_2$  1 h, 另取脱气的 DMSO 33 mL、偶氮二异丁腈 487.79 mg 于 60 °C 水浴锅中加热 5.5 h, 冰浴冷却, 加入 10 倍量甲醇沉淀、洗涤 3 次, 最后在 70 °C 下真空干燥, 得到 *p*(AAm-co-AN)。取上述产物 0.5 g 与 mPEG-SC 0.375 g 共溶于 10 mL DMSO 溶液中, 50 °C 搅拌 8 h 后置于透析袋 (MWCO: 14 kDa) 中透析 48 h, 将胶束溶液冷冻干燥 (-80 °C, 0.08~0.1 MPa) 24 h, 最终得到胶束粉末 *p*(AAm-co-AN)-g-PEG (PAAP), 备用。

**负载 ICG 的温敏胶束的制备** 采用自组装的方法制备复合胶束。首先称取 2 mg ICG 溶解于去离子水中, 在超声的条件下逐滴加入 PAAP 溶液 (ICG : PAAP = 1 : 2) 中, 在室温避光条件下搅拌过夜, 自组装成温敏复合胶束。样品通过高速冷冻离心机 (10 000  $r \cdot \min^{-1}$ ) 离心 40 min 后收集沉淀物, 并用水洗涤直至上清液无色, 以除去未结合的 ICG, 冷冻干燥 (-80 °C, 0.08~0.1 MPa) 24 h, 最终得到温敏复合载体粉末 ICG-PAAP。

**PAAP 的表征** 样品通过 2% 磷钨酸染色后, 利用透射电镜 (TEM) 观察 PAAP 的形貌; 将制备的 PAAP 分散在水中, 采用高分辨粒度分析仪测定样品的粒径分布; 取少量 PAAP 样品粉末与适量溴化钾 (KBr) 研磨压片后在傅里叶红外光谱仪上进行测定; 取适量 PAAP 的冻干粉末溶于 DMSO-d<sub>6</sub> 中, 采用核磁测定聚合物的 <sup>1</sup>H NMR 光谱。

**ICG-PAAP 的表征及临界胶束浓度的测定** 配制适宜浓度的 ICG、ICG-PAAP 溶液在 200~1 000 nm 波长内进行紫外可见近红外吸收光谱的扫描。利用脂溶性的尼罗红作为标记物, 溶解在丙酮中, 浓度为  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。然后分别在 2 mL 不同质量浓度 (0.5~500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 ICG-PAAP 水溶液中加入 0.1 mL 尼罗红的丙酮溶液, 在室温避光的条件下于摇床中震荡过夜, 以挥发丙酮。最后利用荧光分光光度计测定不同浓度样品的尼罗红荧光强度, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 580 nm。

**高临界溶解温度的测定** 将 ICG-PAAP 分散在去离子水中, 采用程序升温的方式从 25 °C 升高至 50 °C, 利用高分辨率粒度分析仪在不同温度点测定粒子粒径。当粒径不再发生变化时的值为胶束 UCST。每个温度点循环测定 3 次, 粒径取平均值。使用温度控制器, 以  $1 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的升温速率从 25 °C 升高至 50 °C, 在设置的温度点通过紫外可见分光光度计于 617 nm 处测定透过率, 当透过率不变时为 UCST, 每个温度

点循环测定 3 次, 透过率取平均值。

**体外光热性能的评价** 将 ICG-PAAP 配成质量浓度为 15、30、60、125、250 和 500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液, 分别吸取 500  $\mu\text{L}$  置于 EP 管中。用 808 nm 近红外激光照射 8 min (功率为  $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), 每隔 1 min 用红外热成像仪测定温度并记录图像。

**DOX 的负载和载药量的测定** 取 DOX 1 mg 与 ICG-PAAP 冻干粉末 10 mg 溶于去离子水中, 在室温下避光搅拌 24 h 后通过高速冷冻离心机 (10 000  $r \cdot \min^{-1}$ ) 离心 40 min 收集沉淀物, 并用水洗涤直至上清液无色, 以除去游离 DOX, 并收集洗涤上清液。利用紫外-可见分光光度计测定 DOX 在 488 nm 处的吸光度, 根据标准曲线计算载药量和包封率。最后冷冻干燥 (-80 °C, 0.08~0.1 MPa) 24 h, 得到载药 DOX-ICG-PAAP 粉末。

称取 DOX-ICG-PAAP 冻干粉末分散在去离子水 ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 中, 与冻干前比较, 观察复溶状态, 主要采用高分辨粒度分析仪测定样品的前后粒径分布。称取适量的 DOX、DOX-ICG-PAAP 冻干粉末溶解在水中, 在 200~1 000 nm 波长内进行紫外可见近红外吸收光谱的扫描, 然后将 DOX-ICG-PAAP 溶液通过高速冷冻离心机离心 (10 000  $r \cdot \min^{-1}$ , 40 min) 收集上清液, 再次进行紫外可见近红外吸收光谱的扫描。

**光控药物释放研究** 将 DOX-ICG-PAAP 粉末分散于 pH 5.0 和 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 于 37 °C 恒温水浴箱中振荡 (100  $r \cdot \min^{-1}$ )。给予或者不给予 2 min 的近红外光 (808 nm,  $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) 照射后, 离心 (10 000  $r \cdot \min^{-1}$ , 40 min) 吸取上清液, 于 488 nm 测定吸光度并计算累积释放率。

**细胞摄取研究** 取处于对数生长期的 MCF-7 细胞, 接种到铺有盖玻片的 6 孔板内, 每孔约  $5 \times 10^4$  个细胞。培养 24 h 待细胞贴壁后吸去培养液, 加入含有游离 DOX 或 DOX-ICG-PAAP (以 DOX 计  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的培养液 1 mL。需要激光处理的实验组, 用近红外激光照射 2 min (808 nm,  $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), 温度控制在 43 °C 以下。继续培养 0.5 或 1 h 后, 分别用 Hoechst 33342 ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和溶酶体绿色荧光探针 ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 染色 15 min, PBS 洗涤后, 用激光共聚焦显微镜观察。

**体外细胞毒性研究** 取对数生长期的 MCF-7 细胞, 按照每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种至 96 孔细胞板中, 待肿瘤细胞贴壁后, 将培养液换成含有不同质量浓度 (20、50、100、200、500、1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) ICG-PAAP 的新鲜培养液; 相同方法加入不同浓度的游离 DOX、DOX-ICG-PAAP 培养液 (质量浓度以 DOX 计, 分别

为 0.1、0.2、1、2、10、20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。激光组: 采用近红外激光 (808 nm,  $2\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) 照射 3 min, 温度控制在  $43\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下, 重复照射 3 次; 对照组不给予照射。细胞继续培养 24 h 后, 采用 MTT 法测定细胞存活率。

**DOX-ICG-PAAP 的体外光热-化疗联合治疗的研究** 按照上述方法铺直径 35 mm 的培养皿, 待 24 h 细胞贴壁后, 将原培养液换成 DOX·HCl 或 DOX-ICG-PAAP 的培养液 (浓度以 DOX 计,  $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。激光组利用 808 nm 近红外激光 ( $2\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) 在室温下照射 2 min, 控制温度不高于  $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 间隔照射 3 次, 培养 3 h 后用 PBS 轻柔洗涤, 加入 0.4% 台盼蓝染色 10 min, 用 PBS 洗涤后用显微镜观察。

## 结果与讨论

### 1 PAAP 的合成及表征

通过 TEM 对 PAAP 进行形貌观察, 利用高分辨率粒径分析仪测定粒径大小。图 1a 为 PAAP 的 TEM 图, 如图所示胶束呈现类球形, 分散均匀, 平均粒径为 45 nm。图 1b 为聚合物胶束的粒径分布图, 由图可知粒径呈正态分布, 大小均一, 具有较好的分散性, 粒径约为 57 nm, 测定结果较 TEM 大, 这主要是由于纳米粒表面水化层所致。

通过红外光谱验证 PAAP 的构建。如图 1c 所示,

$1667\text{ cm}^{-1}$  处为 C=O 的特征伸缩振动峰;  $2881$  和  $2908\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰分别对应  $\equiv\text{CH}$  和  $-\text{CH}_2$  基团,  $3422\text{ cm}^{-1}$  的特征吸收峰对应  $-\text{NH}_2$  基团, 这 3 个峰的形成主要来自于丙烯酸胺;  $2459\text{ cm}^{-1}$  附近的吸收峰归属于丙烯腈的 C=N 伸缩振动。

利用核磁共振氢谱  $^1\text{H NMR}$  分析 PAAP 的结构, 如图 1d 所示, 位于  $\delta\ 3\sim 4$  的峰是聚合物胶束中 mPEG-SC 的特征质子共振峰, 而位于  $\delta\ 7\sim 7.5$  的峰是丙烯酸胺中  $-\text{NH}_2$  的特征质子共振峰, 说明 PAAP 已成功合成。

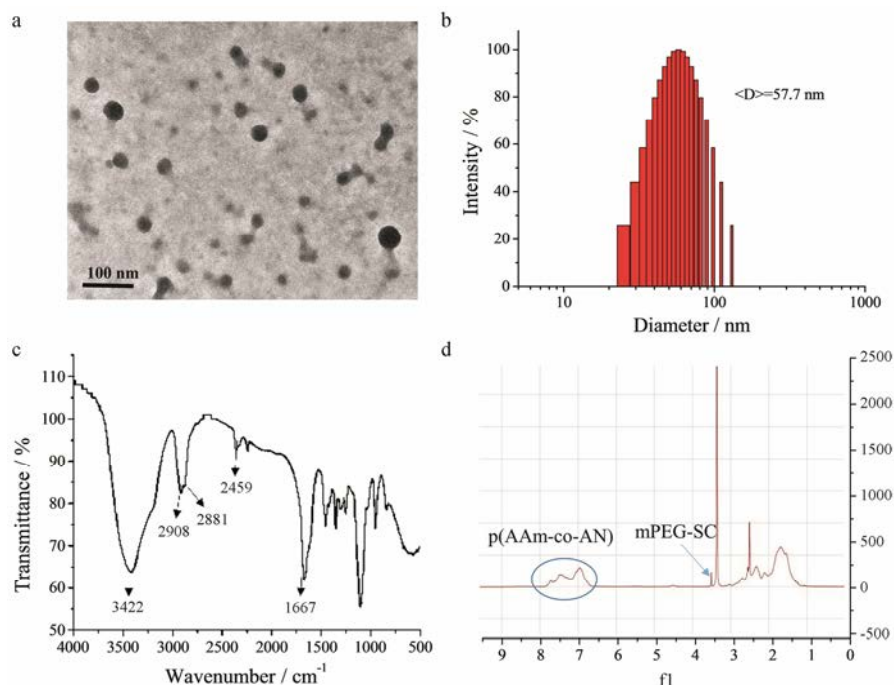
### 2 ICG-PAAP 的表征及临界胶束浓度的测定

ICG-PAAP 的合成通过紫外可见分光光度计进行观察, 由图 2a 可知, 游离 ICG 的特征吸收峰在 780 nm 左右, 同样 ICG-PAAP 聚合物胶束在 780 nm 也存在吸收峰, 说明 ICG 已成功负载到 PAAP 上。

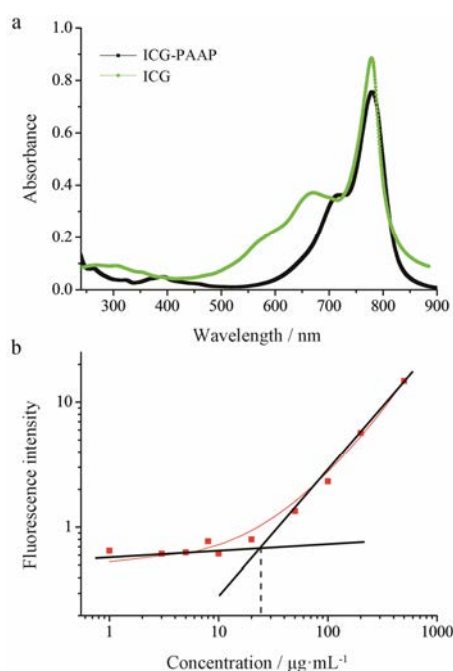
临界胶束浓度 (CMC) 是形成胶束的最低浓度, 其 CMC 越低, 形成的胶束越稳定。通过尼罗红标记物的荧光强度来测定 CMC, 结果见图 2b。当 ICG-PAAP 质量浓度低于  $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 荧光强度一直较弱, 说明此时未形成胶束; 而高于  $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  后, 荧光强度呈线性升高, 说明此时已形成胶束, 该结果显示聚合物胶束的 CMC 在  $24\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  左右。

### 3 高临界溶解温度

UCST 是评价温敏载体对温度敏感性的关键。通

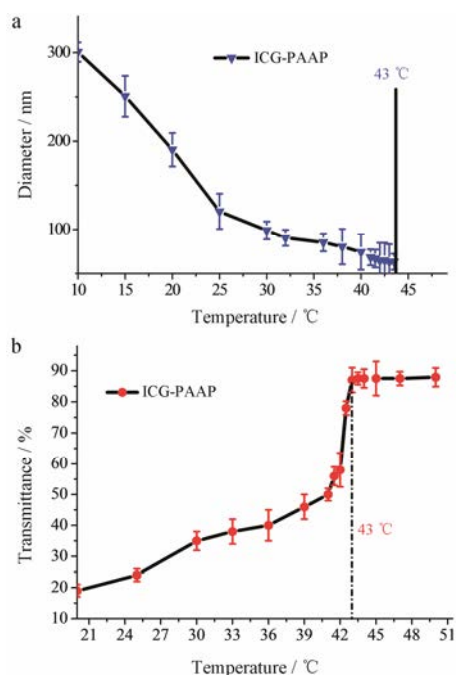


**Figure 1** Transmission electron microscopy and size distributions of *p*(AAm-co-AN)-*g*-PEG (PAAP) micelles (a, b); infrared spectrum and  $^1\text{H NMR}$  spectrum of PAAP micelles (c, d)



**Figure 2** UV-vis-NIR absorption spectra of indocyanine green (ICG) and ICG-PAAP (a); critical micelle concentration curve of ICG-PAAP probed by Nile red (b)

过粒径的变化来观察温敏胶束的 UCST。由图 3a 可知, 随着温度的升高, 胶束的粒径呈负增长, 当温度为 15  $^{\circ}\text{C}$  时粒径约为 250 nm; 37  $^{\circ}\text{C}$  时粒径约 80 nm; 约 43  $^{\circ}\text{C}$  时, 粒径由于太小或太大而不能被检测到, 因此该温度为聚合物胶束的 UCST, 载体在低于此温



**Figure 3** Variation of the diameters of ICG-PAAP as a function of temperature (a); transmittance of ICG-PAAP as a function of temperature (b).  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$

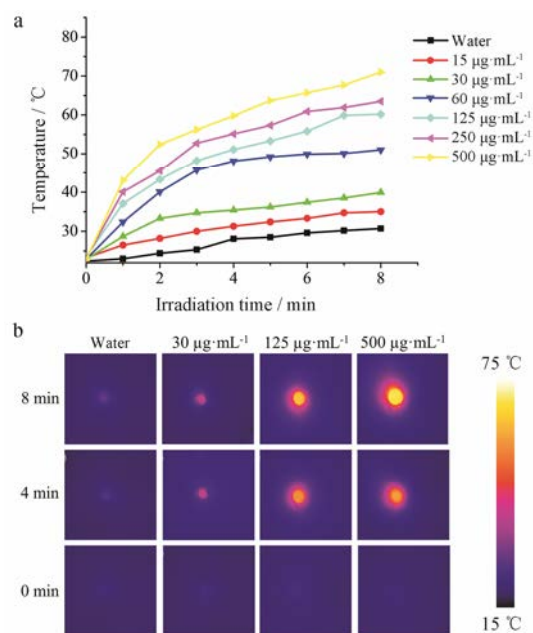
度时可自组装为类球形胶束, 而高于此温度时会发生解聚, 导致粒径变化。图 3b 所示, 透过率也是随着温度的升高, 逐渐变大。当在 43  $^{\circ}\text{C}$  左右时, 保持不变。结果表明, 制得的温敏胶束 UCST 约为 43  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 4 体外光热效果评价

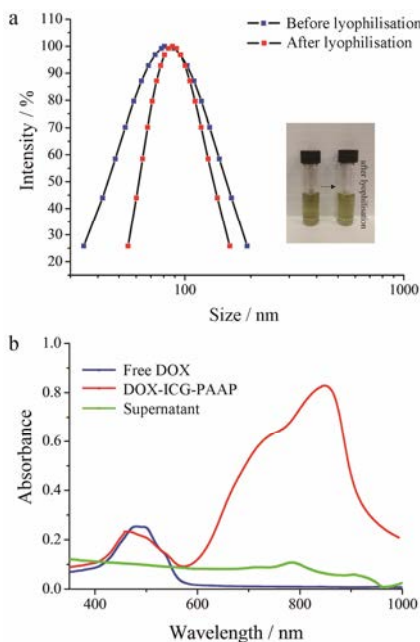
通过近红外激光 (808 nm,  $2\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) 研究 ICG-PAAP 水溶液体外光热性能, 利用近红外成像仪记录温度的变化。图 4a 的升温曲线表明溶液温度与照射时间和溶液浓度呈正相关, 照射 8 min 后, 质量浓度为 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品温度升高至 71  $^{\circ}\text{C}$ , 而对照组升温不明显, 温度仅升高至 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 随着照射时间的延长, 溶液温度逐渐升高。质量浓度为 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品在照射 2 min 时温度为 42  $^{\circ}\text{C}$ , 而照射 8 min 后, 温度升高至 58  $^{\circ}\text{C}$ 。因此, 温度的变化与溶液的浓度和照射时间有关。在相同条件下, 载体浓度越高, 照射时间越长, 其温度越高。图 4b 为近红外激光照射溶液的光热图像, 结果与升温曲线结果一致, 随着载体浓度的增加和照射时间的延长, 温度逐渐升高, 而对照组水的温度变化不明显。以上结果证明, ICG-PAAP 具有较好的光热性能。

#### 5 DOX 的负载和载药量

根据 DOX 浓度-紫外吸光值的标准曲线  $y=0.0222x+0.028$  ( $R^2=0.993$ ), 计算出载药复合胶束的实际载药量为 6.8%, 封装率为 82.6%。冻干前后 DOX-ICG-PAAP 的粒径分布见图 5a, 复溶状态良好, 粒径



**Figure 4** Photothermal heating curves of pure water and ICG-PAAP at various concentrations as a function of time (a); thermographic images of ICG-PAAP *in vitro* (b)

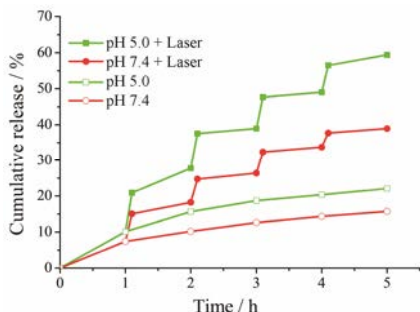


**Figure 5** Size distributions of DOX-ICG-PAAP before or after lyophilisation (a); UV-vis-NIR absorption spectra of DOX, DOX-ICG-PAAP and the supernatant of DOX-ICG-PAAP after centrifugation (b). DOX: Doxorubicin

分别约为 80 和 88 nm，粒径变化不明显，说明冷冻干燥并不会影响样品性质。其成功负载也可通过紫外可见分光光度计进行表征，如图 5b 所示，在 DOX-ICG-PAAP 吸收光谱中，可明显观察到 DOX 位于 480 nm 的吸收峰，表明 DOX 已负载到 ICG-PAAP 上。此外，DOX-ICG-PAAP 离心所得上清液并无明显的吸收峰，说明在冻干过程中无药物泄漏。

### 6 光控药物释放研究

在 pH 5.0 和 7.4 介质中药物释放情况见图 6。第 1 次近红外激光照射后，相比未照射组 DOX 释放量明显提高，累积释放率分别增加了 12% (pH 5.0) 和 7% (pH 7.4)，而当激光关闭后 DOX 的释放量逐渐减少。在药物释放 5 h 后激光组释药明显，累积释放率达 59.4% (pH 5.0) 和 38.9% (pH 7.4)，对照组仅为

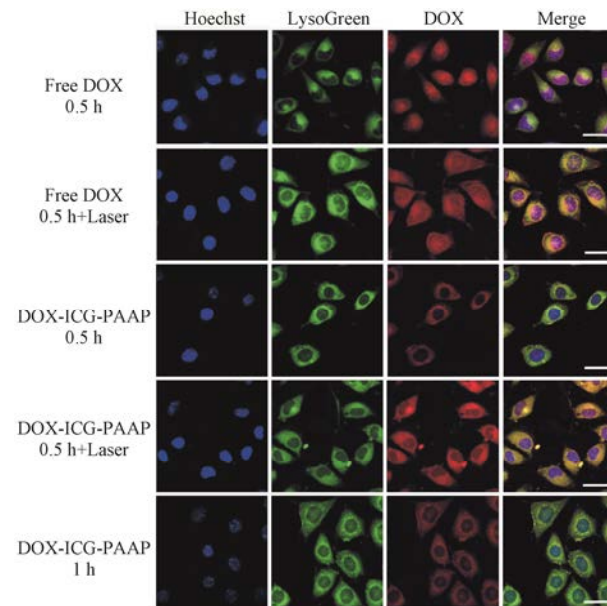


**Figure 6** Cumulative release curves of DOX in phosphate buffer saline (PBS) of pH 7.4 and pH 5.0 with or without laser

22% 和 15.7%。这主要是因为 ICG 将近红外光能转化为热能，使温度升高，达到相变温度时，胶束发生解聚并释放出药物，从而达到快速释放的效果；当激光关闭后，温度下降，低于相变温度时，温敏胶束重新聚合，药物释放缓慢。从图中还可看出，药物释放呈明显的 pH 依赖型，在 pH 5.0 时药物释放较快；在 pH 7.4 时药物释放较慢。这更加有利于药物在肿瘤内环境中的释放。以上结果表明，所制备的胶束具有温敏性，通过控制近红外激光的照射促进药物释放，且具有 pH 敏感性。

### 7 细胞摄取

通过激光共聚焦显微镜考察 MCF-7 肿瘤细胞对游离 DOX 和 DOX-ICG-PAAP 的摄取情况，结果见图 7。红色是 DOX 产生的特征荧光，蓝色是细胞核染料 Hoechst 33342 产生的特征荧光，绿色是溶酶体染料 LysoGreen 产生的特征荧光。由图可知，DOX-ICG-PAAP 在肿瘤细胞摄取 0.5 h 后，未进入细胞核，其红色荧光与溶酶体荧光重叠，说明 DOX-ICG-PAAP 纳米粒通过溶酶体途径摄取。当激光照射后细胞核出现红色荧光，说明 DOX 已经释放。当摄取 1 h 时，可以观察到细胞核内出现少量红色荧光，主要因为随着摄取时间延长，细胞摄取 DOX-ICG-PAAP 的量逐渐增加，由于细胞内的弱酸性环境影响及载体的 pH 敏感性，DOX 会从载体中少量释放，并逐渐扩散至细胞核，引起细胞核内荧光强度增加。游离 DOX 在培养 0.5 h

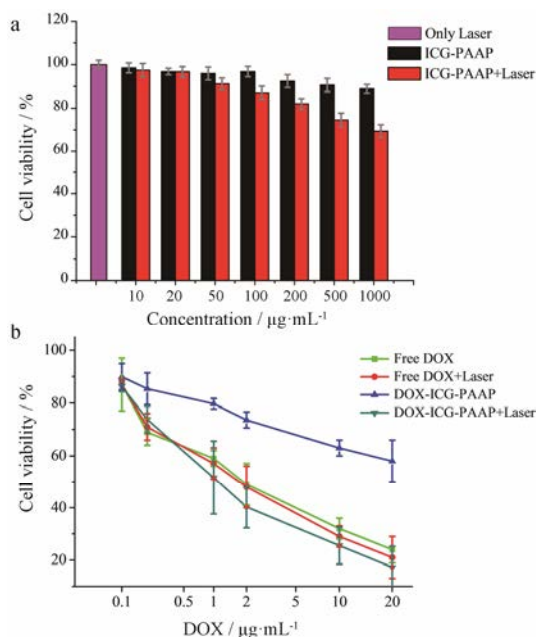


**Figure 7** Cellular uptake of DOX-ICG-PAAP and free DOX in MCF-7 cells with or without laser. Red: DOX fluorescence; Blue: Hoechst 33342 staining of nuclei; Green: LysoGreen staining of lysosome (scale bar, 15  $\mu$ m)

后已被细胞摄取, 并大量扩散至肿瘤细胞核内, 说明游离 DOX 能快速进入细胞核; 给予游离 DOX 激光照射后, 与未激光组相比无明显差别, 说明激光对游离 DOX 无显著影响。以上结果表明, ICG-PAAP 可作为 DOX 药物载体, 能够被细胞摄取, 激光照射后能快速释放药物, 发挥治疗效果。

## 8 细胞毒性

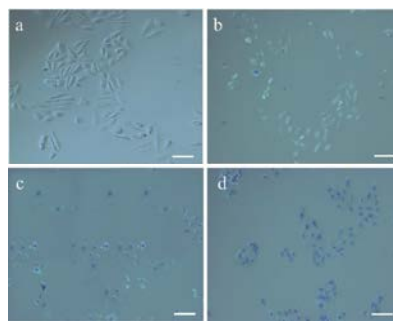
采用 MTT 法研究 ICG-PAAP 对 MCF-7 肿瘤细胞的毒性作用及光热化疗联合的抗肿瘤效果。图 8a 结果显示, 载体无明显细胞毒性, 即使质量浓度高达  $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 细胞存活率仍然高于 90%, 说明 ICG-PAAP 毒性较低, 适合作为药物载体。同时研究了 ICG-PAAP 载体作为辅助治疗的光热治疗效果。载体经近红外光照射, 将温度控制在  $43\ ^\circ\text{C}$  以下时, 细胞存活率虽然有所下降, 但并不明显。图 8b 显示, 近红外光照射后对 DOX 的治疗效果并无明显影响, 说明近红外光不会增加 DOX 的细胞毒性。负载 DOX 后, DOX-ICG-PAAP 表现出一定的细胞毒性, 这主要是由于在溶酶体酸性环境下, DOX 可以释放。当激光照射后, DOX-ICG-PAAP 对 MCF-7 细胞的抑制率高于游离 DOX, 说明在激光照射条件下 DOX 可以快速释放。以上结果表明, ICG-PAAP 载体无明显毒性, 近红外光可促进 DOX-ICG-PAAP 快速释放药物, 从而达到光热-化疗联合抗肿瘤的效果。



**Figure 8** Photothermal toxicity of ICG-PAAP in MCF-7 cells incubated with different concentrations for 24 h (a); the anti-tumor curves of DOX and DOX-ICG-PAAP photothermal or chemo-photothermal therapy (b).  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$

## 9 DOX-ICG-PAAP 的体外光热-化疗联合治疗的研究

图 9 是对 DOX-ICG-PAAP 光热与化疗联合治疗效果的评价。图 9a 为空白对照, 图 9b 结果显示单独光照未见明显的细胞死亡, 图 9c 显示使用游离 DOX 出现部分细胞死亡 (蓝色), 而图 9d 结果表明经近红外光照射的载体使细胞出现大量死亡 (蓝色)。以上结果说明, 单独热疗和化疗效果不显著而制备的载体通过光热可以促进化疗药物释放, 增加细胞毒性, 提高杀伤效果, 为联合治疗提供了平台。



**Figure 9** Microscopic images of MCF-7 cells after treated with control (a), laser (b), DOX (c), DOX-ICG-PAAP + laser (d) (scale bar,  $35\ \mu\text{m}$ )

## 结论

本文通过无规共聚法构建温敏胶束, 并将光敏剂 ICG 负载到聚合物胶束上, 制备了光响应胶束。当近红外光照射时, ICG 将光能转化为热能, 导致温度升高使胶束解聚, 同时释放出药物, 从而实现光热和化疗联合治疗的效果。制备的 DOX-ICG-PAAP 粒径大小均一, 分散性较好, UCST 为  $43\ ^\circ\text{C}$ , 粒径约为  $88\ \text{nm}$ 。载体具有良好的光热性能, 在  $808\ \text{nm}$  激光照射下, 可实现温度快速升高及药物突释。药物释放同时具有 pH 敏感性, 有利于 DOX 在肿瘤微酸性环境中释放。细胞实验表明所制备的空白载体无明显毒性, 而载药载体在激光照射下可快速杀伤肿瘤。上述结果表明, 所构建的温敏胶束在激光触发下可实现肿瘤的快速杀伤, 为肿瘤的特异性治疗提供了可能。

## References

- [1] Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [J]. *Immunity*, 2014, 41: 49–61.
- [2] Liu J, Detrembleur C, Debuigne A, et al. Poly(acrylic acid)-block-poly(vinyl alcohol) anchored maghemite nanoparticles designed for multi-stimuli triggered drug release [J]. *Nanoscale*, 2013, 5: 11464–11477.

- [3] Li JZ, Yuan ZQ, Yan M, et al. pH-sensitive micelles loaded paclitaxel using carboxymethyl chitosan-palmitic acid mediated by cRGD [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 642–649.
- [4] Yin XL, Zhang B, Liu YJ, et al. Advances in polymer-drug conjugated micelles in the delivery of anticancer drugs [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 710–716.
- [5] Guo H, Chen W, Sun X, et al. Theranostic magnetoliposomes coated by carboxymethyl dextran with controlled release by low-frequency alternating magnetic field [J]. Carbohydr Polym, 2015, 118: 209–217.
- [6] Rapoport N. Ultrasound-mediated micellar drug delivery [J]. Int J Hypertherm, 2012, 28: 374–385.
- [7] Talelli M, Hennink WE. Thermosensitive polymeric micelles for targeted drug delivery [J]. Nanomedicine, 2011, 6: 1245–1255.
- [8] He S, Tourkakis G, Berezin O, et al. Temperature-dependent shape-responsive fluorescent nanospheres for image-guided drug delivery [J]. J Mater Chem C, 2016, 4: 3028–3035.
- [9] Seuring J, Agarwal S. Polymers with upper critical solution temperature in aqueous solution [J]. Macromol Rapid Commun, 2012, 33: 1898–1920.
- [10] Huang G, Li H, Feng ST, et al. Self-assembled UCST-type micelles as potential drug carriers for cancer therapeutics [J]. Macromol Chem Phys, 2015, 216: 1014–1023.
- [11] Li WS, Huang LW, Ying XY, et al. Antitumor drug delivery modulated by a polymeric micelle with an upper critical solution temperature [J]. Angew Chem Int Ed, 2015, 54: 3126–3131.
- [12] Huang DH, Qi XY, Ge YR, et al. Application of magnetic iron oxide nanoparticles in magnetic resonance/photothermal dual-modal imaging [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 481–487.
- [13] Hao YW, Zhang BX, Zheng C, et al. The tumor-targeting core-shell structured DTX-loaded PLGA@Au nano-particles for chemo-photothermal therapy and X-ray imaging [J]. J Control Release, 2015, 220: 545–555.
- [14] Moon HK, Lee S, Choi HC. *In vivo* near-infrared mediated tumor destruction by photothermal effect of carbon nanotubes [J]. ACS Nano, 2009, 3: 3707–3713.
- [15] Zhou M, Song SL, Zhao J, et al. Theranostic CuS nanoparticles targeting folate receptors for PET image-guided photothermal therapy [J]. J Mater Chem B, 2015, 3: 8939–8948.
- [16] Zheng MB, Yue CX, Ma Y, et al. Single-step assembly of DOX/ICG loaded lipid-polymer nanoparticles for highly effective chemo-photothermal combination therapy [J]. ACS Nano, 2013, 7: 2056–2067.
- [17] Tang JJ, Mei L, Yu QW, et al. Preparation and evaluation of anti-tumor metastasis of self-assembly micelles loaded with indocyanine green *in vitro* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1933–1941.