

载黑磷量子点脂质体用于宫颈癌光热治疗的体外研究

陈秀丽¹, 周 韵², 梁 欣², 梅 林^{1,2*}, 武小金^{1*}

(1. 清华大学生命科学学院, 北京 100084; 2. 中山大学药学院 (深圳), 广东 广州 510275)

摘要: 本研究制备载黑磷量子点 (BPQDs) 脂质体 (liposome-BPQDs), 探究其理化性质及用于宫颈癌光热治疗的效果。应用超声法制备 BPQDs, 薄膜分散法制备 liposome-BPQDs, 并对其形貌、粒径、电位和拉曼光谱等进行表征。采用 CCK-8 法检测该纳米粒对人宫颈癌细胞 (HeLa) 的毒性。使用激光共聚焦显微镜 (CLSM) 和荧光倒置显微镜分别观察 HeLa 细胞摄取和细胞凋亡情况。结果表明, 扫描电镜下, liposome-BPQDs 呈椭球状或球状; 透射电镜观察显示 liposome-BPQDs 粒径约 90~110 nm。粒径及电位测量结果表明 liposome-BPQDs 粒径为 (104.2 ± 0.35) nm, zeta 电位 (-11.3 ± 3.01) mV。脂质体包封率为 (84.40 ± 2.13) %。在室外通风、温度范围 25 °C~34 °C 和相对湿度 80%~82% 自然条件下, liposome-BPQDs 光热效应良好, 降解较 BPQDs 缓慢。Liposome-BPQDs 可被 HeLa 细胞所摄取; 近红外激光照射后, 载 BPQDs 量达 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, HeLa 细胞死亡率大幅度上升。本研究表明, liposome-BPQDs 稳定性较高, 且具有良好的光热效应, 有望应用于宫颈癌光热治疗。

关键词: 黑磷量子点; 脂质体; 理化性质; 宫颈癌; 光热治疗

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)04-0729-08

In vitro study of black phosphorus quantum dot-loaded liposomes for photothermal therapy of cervical cancer

CHEN Xiu-li¹, ZHOU Yun², LIANG Xin², MEI Lin^{1,2*}, WU Xiao-jin^{1*}

(1. School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. School of Pharmaceutics Science (Shenzhen), Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: In this study, black phosphorus quantum dots (BPQDs)-loaded liposomes (liposome-BPQDs) were prepared to explore physicochemical properties and photothermal effects on cervical cancer cells. BPQDs were fabricated by ultrasonic method. Liposome-BPQDs were prepared by thin film dispersion. Surface morphology, particle size, zeta potential and Raman spectra of liposome-BPQDs were characterized. The cytotoxicity of the liposome-BPQDs against human cervical cancer cells (HeLa) was examined by CCK-8 assay. Confocal laser scanning microscope (CLSM) and fluorescence microscopy were used to observe the uptake and apoptosis of HeLa cells. The results indicated that liposome-BPQDs were ellipsoidal or spherical under scanning electron microscope, TEM observation showed liposome-BPQDs were about 90-110 nm in diameter. The particle size measurements showed liposome-BPQDs were (104.2 ± 0.35) nm in diameter, and zeta potential were examined to be (-11.3 ± 3.01) mV. The encapsulation efficiency was (84.40 ± 2.13) %. Under natural conditions with outdoor ventilation, temperature range of 25 °C–34 °C and relative humidity of 80%–82%, the photothermal effects of liposome-BPQDs was better and the degradation denaturation of liposome-BPQDs were slower than those of BPQDs. The results also reflected that liposome-BPQDs could be uptaken by HeLa cells easily. After near-infrared laser irradiation, the mortality of HeLa cells rise significantly when the amount of BPQDs reach $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. In summary,

收稿日期: 2019-01-10; 修回日期: 2019-01-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81771966); 广东杰出青年科学基金资助项目 (2014A030306036).

*通讯作者 Tel: 86-20-84113997, E-mail: meilin7@mail.sysu.edu.cn; wuxiaojin361@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0033

liposome-BPQDs with high stability exhibited good photothermal effects, which can be expected to be applied to photothermal therapy of cervical carcinoma.

Key words: black phosphorus quantum dot; liposome; physicochemical property; cervical carcinoma; photothermal therapy

恶性肿瘤严重威胁人类健康, 寻求有效治疗方法、提高治愈率是目前生物医学界关注的热点。传统的手术、化疗和放疗等治疗方法具有一定的局限性^[1], 随着科技进步, 光热疗法已经成为一种新的癌症治疗手段。

光热治疗^[2,3]主要是利用致热源的热效应获得较高温度在肿瘤区积聚, 进而达到杀死肿瘤细胞的效果。黑磷(BP)是一种新型二维半导体材料, 近年来被发现可应用于生物医学领域^[4], 一系列关于黑磷的研究^[5]表明黑磷可用于癌症的光热治疗, 由黑磷为材料制备的黑磷量子点(BPQDs)^[6]再度被证实具有高效的近红外光热效应, 可用于杀死肿瘤细胞。此外, 本课题组采用优化的液态剥离法制备黑磷纳米薄片, 研发了一种负载临床化疗药物多柔比星的黑磷纳米片载体系统^[7]。由于黑磷纳米薄片表面易于功能化和较大的比表面积, 为化疗药物分子的大量吸附奠定基础; 优异的光学及光热转化性质使其在 808 nm 激光照射下能够产生局部高热, 可以用于肿瘤的光热治疗, 也能够驱动药物的释放; 对黑磷载药纳米薄片在生物体内的安全性研究表明, 黑磷载药纳米薄片具备很好的生物相容性; 研究中采用的生物响应调节的化疗-光热治疗联合治疗在免疫缺陷的裸鼠身上取得了强化的抑瘤效果。

自 1988 年第 1 个脂质体包裹的药物在美国进入临床试验, 脂质体的研究已经逐步深入, 如: 紫杉醇脂质体^[8,9]、多西紫杉醇脂质体^[10,11]、顺铂脂质体^[12,13]和青蒿素长循环脂质体^[14]等。脂质体因其自身的磷脂双分子层具备亲水的头部和疏水的尾部结构而形成微型囊泡结构, 适用于包裹脂溶性和水溶性药物^[15-17]。此外, 脂质体还具备良好的生物相容性、可生物降解、低免疫原性、无毒、能被细胞摄取等特征, 目前被公认为良好的抗肿瘤纳米载药系统。

本研究通过超声、薄膜分散法^[18,19]制备载黑磷量子点脂质体并对其相关理化性质进行表征, 进一步评价该脂质体的宫颈癌的体外光热治疗效果。

材料与方法

材料与试剂 黑磷晶体(南京牧科纳米科技有限公司); *L-α*-溶血卵磷脂、*L-α*-磷脂酰乙醇胺、4',6'-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、Atto 532 标记 1,2-二醇基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(Atto 532 DOPE)、胆固醇、胆固醇聚

乙二醇(cholesterol polyethylene glycol, cholesterol-PEG 600(美国 Sigma-Aldrich 公司)); *N*-甲基吡咯烷酮(NMP, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 人宫颈癌细胞(HeLa, 美国 ATCC 细胞库); DMEM 培养基(dulbecco's modified eagle medium)、胎牛血清、胰酶(美国 Gibco 公司); 钙黄绿素-AM 和碘化丙啶溶液(Calcein-AM/PI, 北京义翘神州科技有限公司); CCK-8 试剂盒(Cell Counting Kit, 上海碧云天生物技术有限公司)。

主要仪器 超声波细胞粉碎机(Sonics vibra-cell, 美国 SONICS 公司); 真空干燥箱(上海一恒科技有限公司); 电感耦合等离子体发射光谱仪(Arcos IIMV, 德国 SPECTRO 公司); 透射电子显微镜(FEI Tecnai G2 spirit)、冷场发射扫描电子显微镜(HITACHI SU8010, 美国 FEI 公司); 纳米粒度及 zeta 电位仪(Nano ZS, 英国 Malvern 公司); 显微激光共聚焦拉曼光谱仪(Horiba LabRAM HR800, 法国 HORIBA 公司); 808 nm 红外光激光器(北京艾纳捷光电科技有限公司); 激光共聚焦显微镜(FV1000, 日本 Olympus 公司); 荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司)。

BPQDs 制备及浓度测定 称取黑磷晶体 20 mg, 缓慢加入 50 mL NMP 溶液充分研磨, 悬浮液转移至 50 mL 离心管。30% 功率机械超声 12 h, 工作和间歇时间各 5 s, 300 W 冰水浴超声 10 h 后 7 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 吸上清, 20 000 r·min⁻¹ 离心 2 h, 得少量沉淀即 BPQDs。取 BPQDs 样品液 500 μL, 13 000 r·min⁻¹ 离心 1 h, 所得沉淀加双蒸水 500 μL, 转移至 5 mL 耐热玻璃瓶, 加浓硝酸 2 mL 于通风橱内过夜消化, 次日敞口置于 100 °C。

恒温电热套加热, 当瓶内蒸发至 500 μL 液体时, 再加双蒸水 2 mL 继续蒸发, 至 500 μL 液体时, 加入 4.5 mL 双蒸水定容至 5 mL, 用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP)测定样品磷浓度。以磷标液母液浓度(1 000 μg·mL⁻¹)配制 5、0.5、0.1、0.05 和 0.01 μg·mL⁻¹ 磷浓度溶液绘制标准曲线, 待测样品测量值在标准曲线浓度范围内即可, 浓度过高则应稀释后再测定。

空白脂质体(liposome)制备 称取 2.5 mg *L-α*-溶血卵磷脂和 *L-α*-磷脂酰乙醇胺、2 mg PEG-胆固醇、1 mg 胆固醇于 2 mL EP 管中, 加乙醇 1 mL, 旋涡振荡

混匀后移入 25 mL 圆底烧瓶中, 再加乙醇 4 mL, 在 40 °C、140 r·min⁻¹ 抽真空状态下旋蒸 1 h, 将瓶取下用封口膜封口, 扎些许小孔, 真空干燥箱过夜干燥。次日取出, 加 5 mL 双蒸水置 60 °C 恒温水浴水化 5 h, 收集悬液 4 °C 冰箱储存。实验时取样品原液 10 μL 稀释, 探头和水浴各超声 10 min, 0.45 μm 滤器过滤 3 次。

Liposome-BPQDs 的制备及包封率测定 取 BPQDs 样品液 1 mL, 13 000 r·min⁻¹ 离心 1 h, 弃上清得沉淀, 加入脂质体 1 mL, 600 r·min⁻¹ 常温过夜搅拌。次日冰水浴超声 15 min ($P = 300$ W), 匀浆器来回用力杵 250 次以上, 即可得到 liposome-BPQDs 纳米粒。通过 13 000 r·min⁻¹ 高速离心至少 1 h, 可以分离出较纯的 liposome-BPQDs 纳米粒, 加入 ddH₂O 1 mL 充分溶解, 冰水浴超声 20 min ($P = 300$ W), 可放置 4 °C 冰箱保存。用 0.45 μm 过滤器过滤可得粒径较小的纳米粒。根据 BPQDs 原浓度, 计算 200 μL 脂质体溶液中 BPQDs 质量浓度为 10、50、100、150、200、250、300 和 350 μg·mL⁻¹ 所需加入的 BPQDs 量, 每个浓度设 3 个平行, 制备相应包被 BPQDs 的脂质体, 用 200 μL 空白脂质体作对照, 浓硝酸消化后统一测定磷浓度。计算包封率 (encapsulation efficiency, EE), $EE (\%) = (1 - C_0/C_x) \times 100\%$, 其中, C_0 为 200 μL 空脂质体含游离磷总量, C_x 为各个实验组 200 μL liposome-BPQDs 中含磷总量 (其中 $x = 10、50、100、150、200、250、300、350$)。

脂质体表征 分别取脂质体和 liposome-BPQDs 纳米粒原液 10 μL, 加入 ddH₂O 90 μL 稀释, 机械、水浴超声各 15 min, 用 0.45 μm 滤器分别过滤 1 次和 3 次, 纳米粒度及 zeta 电位仪 (Nano ZS) 分别测空白脂质体 (liposome) 和 liposome-BPQDs 的粒径分布、聚合物分散性指数 (polymer dispersity index, PDI) 及电位; 同法, 取过滤 3 次后的滤液 10 μL 滴加到铜网上, 真空干燥后用扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 观测形貌; 同法, 取过滤 3 次后的滤液 10 μL 滴加到铜网上, 静待 3 min 后吸去多余样品, 滴加 10 μL 醋酸铀染 3 min, 再吸去多余染液, 用 10 μL 双蒸水洗 2 次, 3 min/次, 真空过夜干燥, 用透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 观测纳米粒形貌; 将脂质体、liposome-BPQDs 纳米粒样品冰水浴超声 15 min, 滴加 10 μL 样品于 Si 片上, 用显微镜激光共聚焦拉曼光谱仪测定 633 nm 波长下的拉曼光谱, 将所测样品同时置于室外通风、温度范围 25 °C~34 °C 和相对湿度 80%~82% 自然条件下, 再测第 10、20 天时各对应拉曼光谱。

脂质体光热效应比较 取 BPQDs 样品液 2 mL, 13 000 r·min⁻¹ 离心 1 h, 弃上清得沉淀, 加入 ddH₂O 2 mL

形成 BPQDs 水样, 再分别取 2 mL 脂质体、liposome-BPQDs 液, 将 3 份样品分别转移至 2 mL 透明玻璃瓶中, 瓶盖半旋状态暴露于室外通风、温度范围 25 °C~34 °C 和相对湿度 80%~82% 自然条件下, 观察第 1、4、7、10、14、18、21、25 和 35 天样品颜色差异; 以 30 μg·mL⁻¹ BPQDs 浓度再制另外 3 份 2 mL 样品, 用 808 nm 激光 ($P = 1$ W·cm⁻²) 分别测第 1 天及第 1、2、3、4、5 周后光热效应图谱。

细胞毒性检测 将 HeLa 细胞传代培养后接种到 96 孔板, 过夜培养细胞量达 90% 时, 弃旧培养基后分别加入无血清 DMEM 培养液 50 μL, 再分别加入含 0、5、10、20、50、80 和 100 μg·mL⁻¹ 质量浓度 BPQDs 的 liposome-BPQDs 样品 50 μL, 每个浓度设 5 个复孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h, 每孔再分别加入 CCK-8 溶液 10 μL, 37 °C 培养箱孵育 4 h, 酶标仪测定 450 nm 处各孔吸光度 (A) 值, 取 5 个复孔均值, 计算细胞存活率 (CL)。 $CL = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。对照组为没加任何纳米粒的孔, 规定存活率为 100%; 空白组为只含培养基所对应的孔, 规定存活率为 0。同法加入含 0、1、5、10、15、20 和 30 μg·mL⁻¹ 质量浓度 BPQDs 的 liposome-BPQDs 样品 50 μL, 每个浓度孔重复 6 个, 用 808 nm 激光 ($P = 1$ W·cm⁻²) 辐照各孔 10 min, 然后分别孵育 12 和 24 h, 检测计算对应细胞毒性。

HeLa 细胞摄取 荧光脂质体制备: 在脂质体制备所需样品充分溶解前, 另加 0.05 mg Atto532 DOPE, 得到红色荧光脂质体; 制备 Cy5.5 标记的 BPQDs: 取 BPQDs 样品液 1 mL, 13 000 r·min⁻¹ 离心 1 h, 弃上清得沉淀后加入 ddH₂O 1 mL, 加入 1 μL Cy5.5, 常温 600 r·min⁻¹ 搅拌过夜。次日取出, 13 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 弃上清, 加 ddH₂O 重复洗 3 次, 最后得沉淀即为 Cy5.5 标记的 BPQDs, 同法可得到 Cy5.5 标记的 liposome-BPQDs。在 T25 培养瓶中传代培养 HeLa 细胞至第 3 代时接种到 12 孔板, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中过夜培养, 次日每孔弃掉旧培养基, 加入不含胎牛血清的 DMEM 培养基 1 mL 和 Cy5.5 标记的 liposome-BPQDs 200 μL, 孵育 3 h 后弃旧培养液, 用 1×磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 5 min/次, 再用 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 冲洗 3 次, DAPI 染核 15 min, 再用 PBS 洗 2 次, 粘片干燥后用激光共聚焦显微镜观察 HeLa 细胞对纳米粒的摄取效果。

HeLa 细胞凋亡检测 将 HeLa 细胞传代培养后接种到 12 孔板, 过夜培养细胞量达 70% 时, 弃旧培养基后加入无血清 DMEM 培养液 800 μL, 再分别加入含 0、5、10、20、30 和 40 μg·mL⁻¹ 质量浓度 BPQDs 的 liposome-

BPQDs样品 200 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 3 h, 用 808 nm 激光 ($P = 1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) 光照各样品 10 min, 每孔再分别加入 AM 和 PI 各 1.5 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h, 收样制片后用荧光倒置显微镜观察细胞凋亡情况。

结果

1 脂质体和载黑磷量子点脂质体的表征

在 SEM 下黑磷晶体呈片状堆叠结构 (图 1a), BPQDs (图 1b) 直径大多分布在 5~20 nm 内, 容易聚集形成大颗粒; liposome (图 1c) 和 liposome-BPQDs (图 1d) 呈椭球状或球状, 直径约在 100~150 nm 内; TEM 结果显示 liposome (图 1e) 直径约 100~120 nm, liposome-BPQDs (图 1f) 直径约 90~110 nm。粒径及电位结果 (图 1g~i) 表明用 0.45 μm 滤器过滤 3 次后脂质体 (liposome #3 和 liposome-BPQDs #3) 粒径比过滤 1 次所得的脂质体 (liposome #1 和 liposome-BPQDs #1) 粒径小, liposome 粒径为 $(101.9 \pm 7.3) \text{ nm}$, zeta 电位 $(-16.3 \pm 1.23) \text{ mV}$, PDI 约为 0.282 ± 0.008 ; liposome-BPQDs 粒径为 $(104.2 \pm 0.35) \text{ nm}$, zeta 电位 $(-11.3 \pm 3.01) \text{ mV}$, PDI 约为 0.217 ± 0.007 。表征结果表明, 所制备的 liposome-BPQDs 在水溶剂中能够较稳定地分散, 该纳米粒的大小有助于作为药物载体富集在肿瘤细胞中并长期滞留发挥高通透

性和滞留效应 (EPR 效应)。

2 脂质体包封率

黑磷单晶颗粒样品 (图 2a), 尺寸 0.1 mm~1 cm, 制备成 BPQDs, 其粒径约为 5~15 nm, 为进一步探究 liposome 对 BPQDs 包封平衡时 BPQDs 的浓度, 用超速离心法分离 liposome-BPQDs 和游离 BPQDs, 通过 ICP 测定磷浓度, 根据公式计算包封率。由图可知, 随 BPQDs 浓度增加, 包封率逐渐增大, 当质量浓度达到 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右时脂质体的包封量达到最大平衡量 (图 2b), 此时脂质体的包封率为 $(84.40 \pm 2.13) \%$ 。

3 Liposome 和 liposome-BPQDs 降解及拉曼光谱比较

如图 3a 所示, 随着天数增加, BPQDs 水样中颜色变化较明显, 说明 BPQDs 正在逐步降解, 空气中氧气、二氧化碳和水等分子可将黑磷 (BP) 部分氧化分解生成磷酸根离子和亚磷酸根离子等小分子产物。正常条件下 BP 应该避光、干燥保存。Liposome 水溶液颜色几乎没有变化, 说明 liposome 在水溶液体系中较稳定, liposome-BPQDs 样品液颜色有变浅趋势, 但程度上小于 BPQDs 水样, 说明该脂质体在自然条件下的稳定性较 BPQDs 好。在波长 633 nm 下测定的拉曼光谱中 BPQDs 第 10 和 20 天中间峰值位点的蓝移结果表明 BPQDs 随时间而发生振动变化 (图 3b), liposome-BPQDs 与 BPQDs 相比峰值位点变化量明显较小

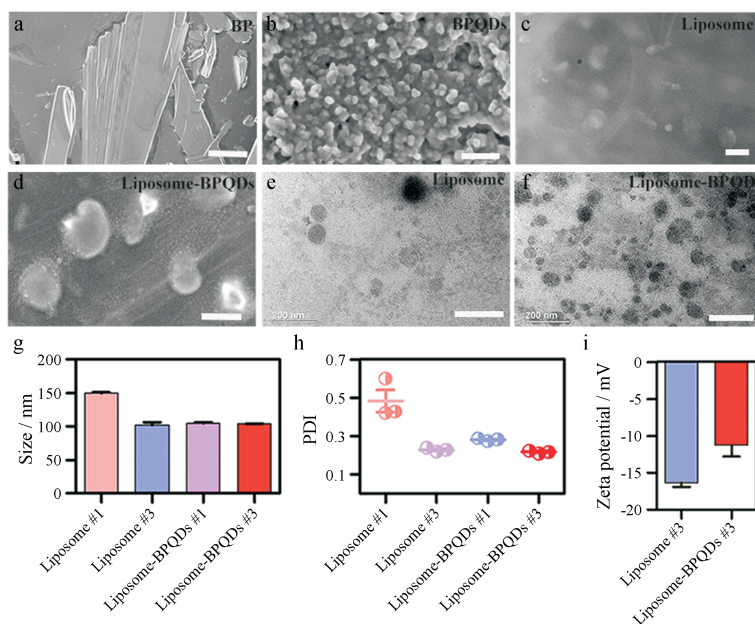


Figure 1 Characterization of liposome and liposome-BPQDs. a: Scanning electron microscope (SEM) image of black phosphorus (BP) single crystal particles (scale bar, 15 μm); b: SEM image of BPQDs (scale bar, 150 nm); c: SEM image of liposome (scale bar, 200 nm); d: SEM image of liposome-BPQDs (scale bar, 200 nm); e: Transmission electron microscope (TEM) image of liposome (scale bar, 200 nm); f: TEM image of liposome-BPQDs (scale bar, 200 nm); g, h, i: The particle size distributions, polymer dispersity index (PDI), zeta potential of liposome and liposome-BPQDs with 0.45 μm filters for one time (liposome #1, liposome-BPQDs #1) and three times (liposome #3, liposome-BPQDs #3). BPQDs: black phosphorus quantum dots

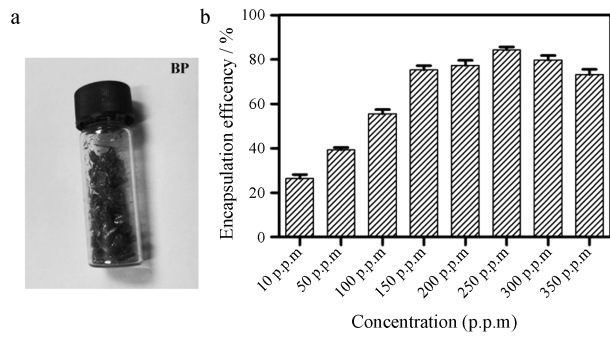


Figure 2 Encapsulation efficiency of liposome. a: Image of black phosphorus (BP) single crystal particles; b: Encapsulation efficiency of liposome with different concentrations (10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 p.p.m) of BPQDs. The concentration of 10 p.p.m BPQDs is equal to $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BPQDs

(图 3c), 说明该脂质体稳定性较好。

4 BPQDs 和 liposome-BPQDs 光热效应比较

初始 BPQDs 为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 用 808 nm 近红外激光 ($P = 1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) 分别连续光照 10 min 测 200 μL liposome、BPQDs 和 liposome-BPQDs 在第 1 天 (day 0) 及 1、2、3、4 和 5 周的光热图谱。图 4a~f 结果一致表

明, liposome 光热效应较弱, BPQDs 具有较好的光热效应, liposome-BPQDs 光热效应较 BPQDs 弱, 但随天数增加, 3 周后两者光热效应强度呈现逆转, 说明 BPQDs 在自然条件下由于降解使光热效应逐步减弱, 而 liposome-BPQDs 因为脂质体的稳定性包被, 内含 BPQDs 物质降解速率较慢。图 4g~i 是 3 种物质自身的光热效应随时间变化图, 同样表明脂质体在水溶液中具有较强的稳定性, liposome-BPQDs 光热效应减弱速度小于 BPQDs 水溶液, 进一步表明 liposome-BPQDs 在水溶剂中稳定性较好。

5 细胞毒性检测

将不同浓度 liposome-BPQDs 分别与 HeLa 细胞置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h 和 808 nm 激光照射 10 min 后置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 12 和 24 h 后, 检测对应的细胞相对存活率。如图 5a, 载不同黑磷量子点浓度 (0、5、10、20、30、40、50、80、100 和 120 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 脂质体与 HeLa 细胞孵育 24 h 后, 细胞相对存活率均在 85% 以上, 说明该纳米粒在载 BPQDs 质量浓度 $0 \sim 120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内对 HeLa 细胞活性没有太大影响, 表

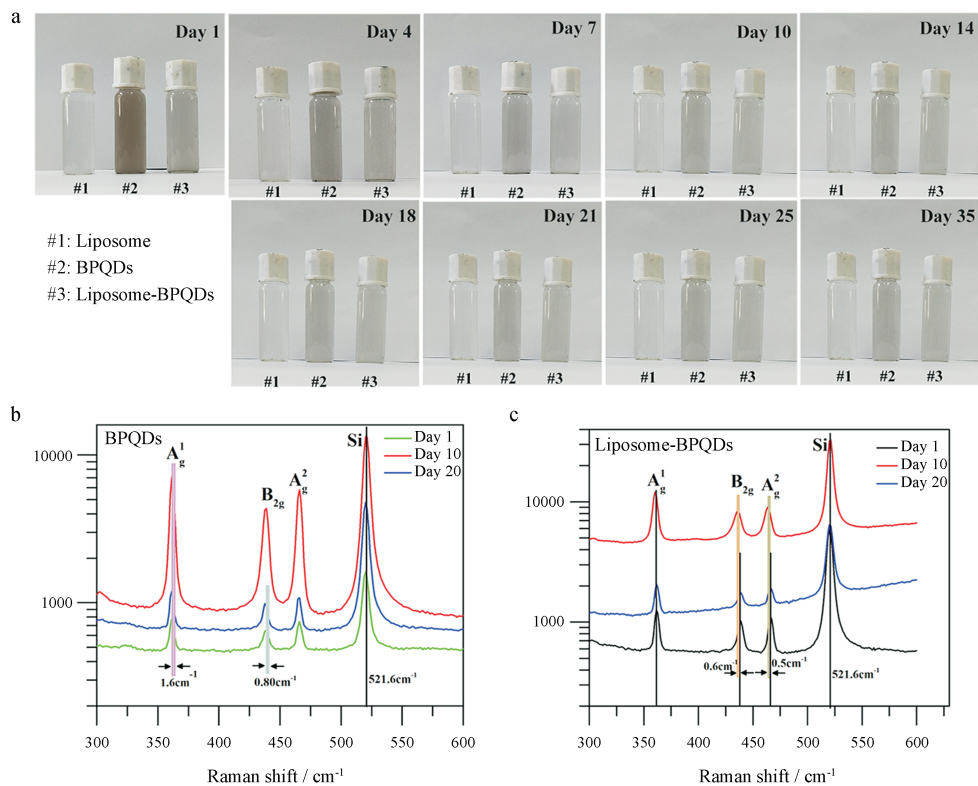


Figure 3 Degradation and Raman spectroscopy of BPQDs and liposome-BPQDs. a: Images of the color differences of the samples 2 mL liposome, BPQDs water sample ($30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), liposome-BPQDs water sample (with the same concentration of $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BPQDs) observed on the 1st, 4th, 7th, 10th, 14th, 18th, 21st, 25th and 35th days under natural conditions of outdoor ventilation, temperature range of $25 \text{ }^\circ\text{C} \sim 34 \text{ }^\circ\text{C}$ and relative humidity of 80%-82%; b: The corresponding Raman spectra of 633 nm wavelength of 1 mL BPQDs, liposome-BPQDs water sample measured on the first day (day 1), the 10 th day (day 10), and the 20 th day (day 20) under the same natural conditions of outdoor ventilation, temperature range of $25 \text{ }^\circ\text{C} \sim 34 \text{ }^\circ\text{C}$ and relative humidity of 80%-82%

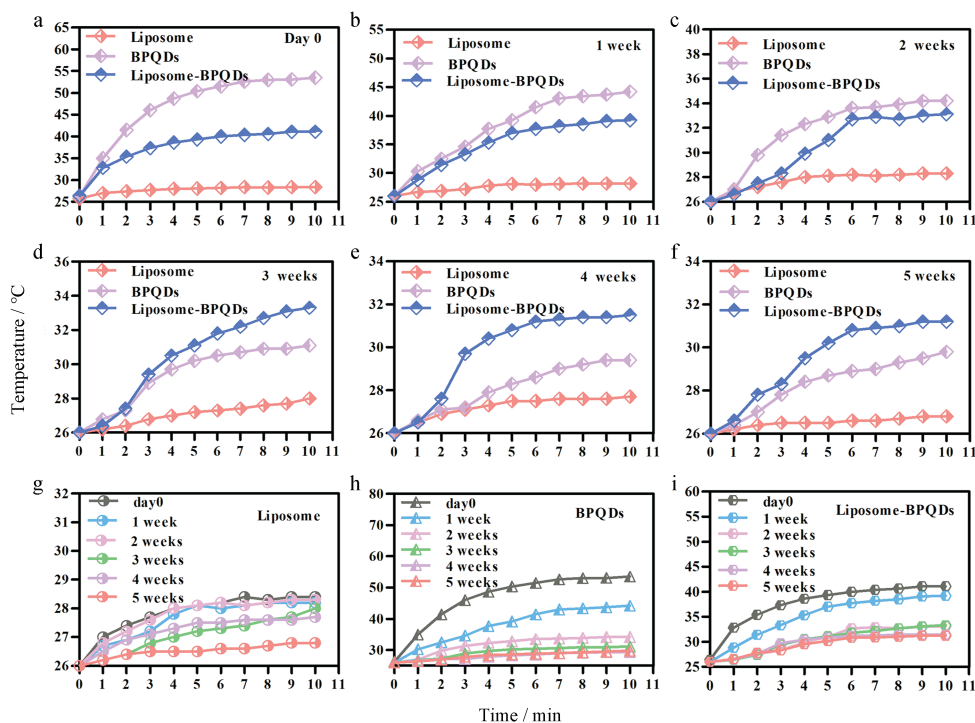


Figure 4 Comparison of photothermal effects of BPQDs and liposome-BPQDs. a-i: The photothermal effect spectra of the samples of 2 mL liposome, BPQDs water sample ($30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), liposome-BPQDs water sample (with the same concentration of $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BPQDs) measured by 808 nm laser ($P = 1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) on the first day (day 0), 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks and 5 weeks after exposed the natural conditions of outdoor ventilation, temperature range of $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ - $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of 80%-82%

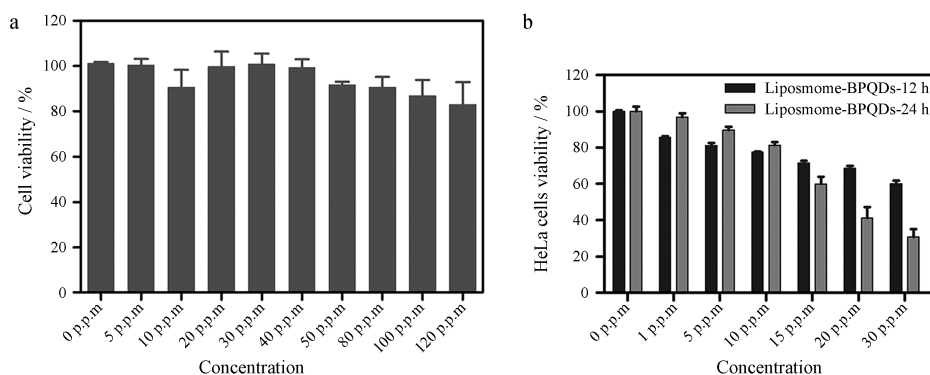


Figure 5 Cytotoxicity test for liposome-BPQDs. a: The relative viability of HeLa cell after incubated with liposome-BPQDs with different concentrations (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) of BPQDs in $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 incubator for 24 h; b: The relative viability of HeLa cell after incubated with liposome-BPQDs with different concentrations (0, 1, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) of BPQDs in $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 incubator for 12 h (liposome-BPQDs-12 h), 24 h (liposome-BPQDs-24 h) after irradiated with the 808 nm laser ($P = 1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) for 10 min

明该浓度范围内 liposome-BPQDs 对 HeLa 细胞无伤害用, 可为宫颈癌的体内研究提供材料支持。HeLa 细胞与载不同黑磷量子点浓度 (0、1、5、10、20 和 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 脂质体孵育 4 h 后, 808 nm 激光 ($P = 1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) 辐照 10 min, 再置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中分别孵育 12 和 24 h 所对应的细胞存活率, 如图 5b 所示。结果表明, 激光辐射后细胞的存活率普遍下降, 当 liposome-BPQDs 中 BPQDs 质量浓度为 $0 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时孵育

24 h 对于细胞的伤害程度与孵育 12 h 无明显差异, BPQDs 浓度为 $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 孵育 24 h 对细胞的伤害程度明显大于孵育 12 h, 当 BPQDs 质量浓度达到 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞存活量已降低到 30% 左右, 这说明载适宜浓度 BPQDs 的脂质体具有的光热辐射确实有助于杀死癌细胞。

6 HeLa 细胞摄取 liposome-BPQDs

激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM) 观察 HeLa 细胞

对脂质体的摄取,如图6所示。DAPI 染核, Cy5.5 标记 BPQDs, Atto 532 DOPE 标记脂质体, 结果表明 HeLa 细胞能较好地摄入 liposome-BPQDs, 其主要分布在细胞质内。liposome-BPQDs 被 HeLa 细胞摄取主要是依靠受体介导的细胞内吞作用或与细胞膜融合过程而进入细胞内, 脂质体制备中添加胆固醇聚乙二醇 (cholesterol-PEG 600), 由于 PEG 的修饰作用, 更有助于该脂质体与细胞膜表面的受体结合, 从而有助于该纳米粒较多地被 HeLa 细胞摄入, 表明该纳米粒可作为良好的药物载体被肿瘤细胞摄取, 并用于肿瘤的光热治疗。

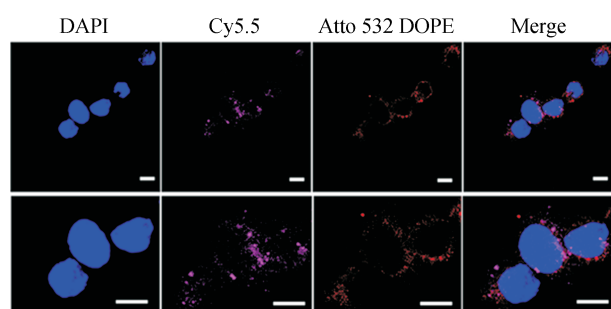


Figure 6 Uptake of liposome-BPQDs nanoparticles by HeLa cells. Observation of cellular uptake of liposome-BPQDs (250 μL) by confocal laser scanning microscope (CLSM) with DAPI staining of HeLa cells nuclei, Cy5.5-labelled BPQDs, Atto 532 DOPE-labelled liposomes (all scale bars, 10 μm)

7 HeLa 细胞凋亡检测

利用荧光倒置显微镜观察 HeLa 细胞凋亡情况, 如图7所示。经 Calcein-AM/PI 双染后, 绿色荧光区域代表活细胞, 红色荧光区域代表死细胞, 随 liposome-BPQDs 中 BPQDs 浓度增加, 细胞死亡率逐步增大, 当 BPQDs 浓度在 $0\sim 20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 细胞存活量较大, 当浓度为 $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 可看到细胞几乎全部凋亡, 说明 BPQDs 在 $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下已具有良好的光热效应, 可杀死肿瘤细胞。此结果表明 BPQDs 可作为一种新型纳米材料用于肿瘤光热疗法。本研究中, 脂质体包被 BPQDs 得到的纳米粒稳定性优于 BPQDs。Liposome-BPQDs 因为黑磷具有良好的光热效应特征, 可作为一种新型的纳米载药体系应用于抗肿瘤光热治疗中。

讨论

脂质体纳米载药系统在近些年的药物研发和肿瘤治疗研究中被广泛应用。传统的脂质体具有稳定性较差的缺陷, 因此在制备新型的脂质体载药系统时, 为提高脂质体的稳定性, 可加入不同的修饰物, 如甲氧基聚乙二醇 2000-二硬脂酸磷脂酰乙醇胺 (mPEG2000-

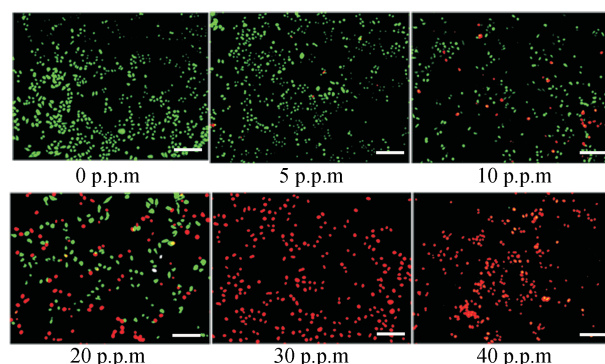


Figure 7 Apoptosis detection of HeLa cells. The apoptosis of HeLa cells observed by fluorescence inversion microscopy after incubated with liposome-BPQDs with different concentrations (0, 5, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of BPQDs in 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 incubator for 2 h after irradiated with the 808 nm laser ($P = 1\ \text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 10 min. Cells stained with Calcein-AM/PI, the green fluorescence region represents living cells and the red fluorescence region represents dead cells.(all scale bars, 100 μm)

DSPE)、聚氧化乙烯 (PEO)、环糊精、壳聚糖和聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯 (Tween-80) 等对脂质体表面进行修饰^[20-22]。聚乙二醇 (PEG) 亲水性质可有助于提高脂质体的相对稳定性及靶向载药在体内的长效循环^[23]。为避免表面电荷影响载药脂质体体内循环时间^[24], 本研究所制备脂质体为中性脂质体, 胆固醇为该脂质体合成必备原料之一, cholesterol-PEG 600 表面带电荷为 0, 且部分化学结构与胆固醇相似, 因此, 本研究在脂质体的表面采用 cholesterol-PEG 600 修饰, 不仅对 BPQDs 包封量没有阻碍, 而且也能实现 PEG 修饰效果, 减缓脂质体载药纳米粒被机体免疫系统识别和吞噬。本研究通过薄膜分散法、超声和过滤法制备 liposome-BPQDs 纳米粒, 探究其理化性质及应用于宫颈癌光热治疗的效果。

实验结果表明, 制备的 liposome-BPQDs 粒径小于 200 nm, 符合文献^[25]报道纳米药物载体易被细胞摄取的粒径范围, 也意味着本研究中 cholesterol-PEG 600 修饰的 liposome-BPQDs 可以很好地通过 EPR 效应在肿瘤部位富集, 避免被网状内皮系统清除。BPQDs 具有良好的光热效应、无毒和可生物降解特征。Liposome-BPQDs 具有良好的光热效应且稳定性优于 BPQDs。细胞摄取实验表明, HeLa 细胞可以有效摄取 liposome-BPQDs 纳米粒, 说明该纳米粒可作为相对稳定的载药体系应用于肿瘤的光热治疗。

本研究制备的 liposome-BPQDs 具备脂质体和 BPQDs 双重优势, 具有较好的光热效应及较稳定的理化性质, 脂质体包被有助于提高 BPQDs 的稳定性。以

HeLa细胞摄取和凋亡检测为研究切入点,未来的研究可以在载黑磷量子点脂质体体系基础上载入更多不同的药物,实现多药物共载机制,还可将光热疗法、化疗和免疫治疗等抗肿瘤治疗方法综合应用实现多模式治疗,进一步提升对肿瘤细胞的有效杀伤力。

References

- [1] Wang HH, Fu ZG, Wen N, et al. The applications and prospects of doxorubicin-photodynamic combination therapy in malignant tumors [J]. Chin J Geriatr Dentist (中华老年口腔医学杂志), 2018, 16: 51-54, 60.
- [2] Bilici K, Muti A, Duman FD, et al. Investigation of the factors affecting the photothermal therapy potential of small iron oxide nanoparticles over the 730 – 840 nm spectral region [J]. Photochem Photobiol Sci, 2018, 17, 1787-1793.
- [3] Li Y, Wang X, Gao L, et al. Aptamer-conjugated gold nanostars for targeted cancer photothermal therapy [J]. J Mater Sci, 2018, 53: 14138-14148.
- [4] Shao JD, Xie HH, Huang H, et al. Biodegradable black phosphorus-based nanospheres for *in vivo* photothermal cancer therapy [J]. Nat Commun, 2016, 7: 12967.
- [5] Ren X, Li Z, Huang Z, et al. Environmentally robust black phosphorus nanosheets in solution: application for self-powered photodetector [J]. Adv Funct Mater, 2017, 27: 1606834.
- [6] Li Y, Liu Z, Hou Y, et al. Multifunctional nanoplatform based on black phosphorus quantum dots for bioimaging and photodynamic/photothermal synergistic cancer therapy [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9: 25098-25106.
- [7] Tao W, Zhu X, Yu X, et al. Black phosphorus nanosheets as a robust delivery platform for cancer theranostics [J]. Adv Mater, 2017, 29: 1603276.
- [8] Ramadass SK, Anantharaman NV, Subramanian S, et al. Paclitaxel/epigallocatechin gallate co-loaded liposome: a synergistic delivery to control the invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 125: 65-72.
- [9] Ruttala HB, Ko YT. Liposome encapsulated albumin-paclitaxel nanoparticle for enhanced antitumor efficacy [J]. Pharm Res, 2015, 32: 1002-1016.
- [10] Tagami T, Kubota M, Ozeki T. Effective remote loading of doxorubicin into DPPC/poloxamer 188 hybrid liposome to retain thermosensitive property and the assessment of carrier-based acute cytotoxicity for pulmonary administration [J]. J Pharm Sci, 2015, 104: 3824-3832.
- [11] Das A, Adhikari C, Nayak D, et al. First evidence of the liposome-mediated deintercalation of anticancer drug doxorubicin from the drug-DNA complex: a spectroscopic approach [J]. Langmuir, 2016, 32: 159-170.
- [12] Wang L, Yang CQ, Wang J. Assemble of magnetic nanoparticles into the structure of cisplatin liposome [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2011, 46: 592-598.
- [13] Catanzaro D, Nicolosi S, Cocetta V, et al. Cisplatin liposome and 6-amino nicotinamide combination to overcome drug resistance in ovarian cancer cells [J]. Oncotarget, 2018, 9: 16847-16860.
- [14] Yu YL, Zheng ZY, Yi CC, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of artemisinin loaded long-circulating liposomes [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2018, 53: 1002-1008.
- [15] Baek JS, Cho CW. A multifunctional lipid nanoparticle for co-delivery of paclitaxel and curcumin for targeted delivery and enhanced cytotoxicity in multidrug resistant breast cancer cells [J]. Oncotarget, 2017, 8: 30369-30382.
- [16] Battaglia L, Serpe L, Foglietta F, et al. Application of lipid nanoparticles to ocular drug delivery [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2016, 13: 1743-1757.
- [17] Xia S, Tan C, Zhang Y, et al. Modulating effect of lipid bilayer-carotenoid interactions on the property of liposome encapsulation [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 128: 172-180.
- [18] Silva R, Ferreira H, Little C, et al. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation [J]. Ultrason Sonochem, 2010, 17: 628-632.
- [19] Zhang H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation [M]//D'Souza GGM. Liposomes: Methods and Protocols. New York: Humana Press, 2017, 1522: 17-22.
- [20] Lee JS, Hwang SY, Lee EK. Imaging-based analysis of liposome internalization to macrophage cells: effects of liposome size and surface modification with PEG moiety [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 136: 786-790.
- [21] Zhang XB, Hou XP. Comparative efficacy and distribution of evans blue liposome modified with DSPE-PEG, Tween 80, and Brij35 [J]. J Chin Pharm Sci, 2003, 12: 71-75.
- [22] Wang H, Zhao P, Liang X, et al. Construction of a novel cationic polymeric liposomes formed from PEGylated octadecyl-quaternized lysine modified chitosan/cholesterol for enhancing storage stability and cellular uptake efficiency [J]. Bioethanol Bioeng, 2010, 106: 952-962.
- [23] Yang F, Qin A, Li J, et al. Targeting and long circulating drug delivery system base on mannose-conjugated PEG-modified nano-liposomes for tumor chemotherapy [J]. Acta Laser Biol Sin (激光生物学报), 2017, 26: 334-341.
- [24] Yang YF, Xie XY, Yang Y, et al. A review on the influences of size and surface charge of liposome on its targeted drug delivery *in vivo* [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2013, 48: 1644-1650.
- [25] Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices [J]. J Control Release, 2001, 70: 1-20.