

## 肿瘤微环境响应的仿生金属纳米粒用于光动力学治疗的研究

郑蓉蓉, 赵林平, 陈华清, 李仕颖\*, 余细勇\*

(广州医科大学药学院, 广东省分子靶标与临床药理学重点实验室, 呼吸疾病国家重点实验室  
药理学组, 广东 广州 511436)

**摘要:** 本文基于生物配位化合物和仿生金属蛋白的概念, 将组氨酸修饰的光敏剂功能化序列与锌离子配位, 形成仿生金属纳米粒 (nanoparticles, NPs)。NPs 在高谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和低 pH 值的肿瘤微环境条件下可被降解释放, 进而实现肿瘤光动力学治疗。通过检测 NPs 的粒径、电势、紫外吸收和荧光吸收对其进行结构性表征, 应用单线态氧绿色荧光探针 (single oxygen sensor green, SOSG) 试剂盒检测 NPs 体外单线态氧的产生, 以小鼠乳腺癌细胞 4T1 为研究对象, 考察 NPs 的亚细胞器分布和细胞毒性等。研究结果表明, NPs 具有良好的分散性和稳定性, 结构均一, 粒径约为 165 nm, 具有肿瘤微环境响应性, 能有效抑制 4T1 细胞活性, 诱导细胞凋亡。本研究表明, 基于组氨酸和锌离子配位的仿生纳米药物具有良好的生物相容性和小鼠乳腺癌细胞毒性, 该组装配位策略可为开发新型智能纳米药物带来新思考。

**关键词:** 组氨酸; 锌离子; 纳米药物; 配位效应; 肿瘤微环境; 光动力学治疗

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2020)07-1672-08

## Tumor microenvironment responsive biomimetic nanoparticles for photodynamic tumor therapy

ZHENG Rong-rong, ZHAO Lin-ping, CHEN Hua-qing, LI Shi-ying\*, YU Xi-yong\*

(Guangdong Key Laboratory of Molecular Target and Clinical Pharmacology, State Key Laboratory of Respiratory Diseases Pharmacology Group, School of Pharmaceutical Sciences of Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

**Abstract:** Inspired by the coordination effects between imidazole and metal ions in hemoglobin, biomimetic nanoparticles were constructed for photodynamic tumor therapy. The photosensitizer of protoporphyrin IX (PpIX) was modified with histidine, which could be self-assembled with  $Zn^{2+}$  to obtain the biomimetic nanoparticles (NPs). Under the conditions of high glutathione and low pH, the biomimetic nanoparticles could be degraded and released for enhanced photodynamic tumor therapy. The structures of NPs were characterized by dynamic light scattering (DLS), UV-visible spectrophotometer (UV-Vis), fluorescence microscope and transmission electron microscope (TEM). The reactive oxygen species (ROS) production ability of NPs was measured by singlet oxygen sensor green (SOSG) test kit. Mouse breast cancer cell lines (4T1 cells) were employed to investigate the subcellular organelle distribution and cytotoxicity of NPs. These results confirmed that NPs possessed a good dispersibility and stability with a uniform structure and particle size at 165 nm. Moreover, MTT assay and live/dead cell staining assay demonstrated that NPs could inhibit the proliferation of 4T1 cells and exhibit a good biocompatibility. This research would promote the construction of intelligent biomedicine for tumor precision therapy.

**Key words:** histidine; zinc; nanomedicine; coordination effect; tumor microenvironment; photodynamic therapy

收稿日期: 2020-01-16; 修回日期: 2020-02-26.

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金重点项目 (U1601227); 广东省科技计划重大专项 (2015B020225006).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-20-37103261, E-mail: lisy-sci@gzhmu.edu.cn; yuxycn@aliyun.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0061

光动力学治疗 (photodynamic therapy, PDT) 是指通过特定波长的激光照射富集在肿瘤部位的光敏剂, 使光敏剂活化, 活化的光敏剂将能量传递给周围的氧, 其生成的具有强氧化性的活性氧自由基会对生物体 (如蛋白质和 DNA 等) 造成不可逆的损伤<sup>[1]</sup>。在众多新型癌症治疗方法中, 光动力学治疗以其高效、低毒、非侵入性及时空可控性等精准治疗的优点成为目前肿瘤治疗研究领域中的热点<sup>[2,3]</sup>。

传统的药物传递系统 (drug delivery system, DDS) 如硅胶球、脂质体和微球等, 其目的在于提高药物水溶性和生物利用度, 同时提高药物靶向性。现代药物传递系统可以将药物靶向递送至靶点部位以提高治疗效果降低毒副作用。但是, 现有的药物递送载体大部分是合成载体, 在制作过程中多会使用毒性有机溶剂且难以规模化制备, 合成载体的潜在毒性和生物相容性等问题极大地限制了其在临床上的应用。相比之下, 配位组装纳米药物的制备过程非常简单且易于操作, 配合物的可选择性赋予组装纳米药物良好的生物相容性, 更为重要的是, 组装纳米药物在靶点的响应释放避免了药物在非靶部位的毒副作用。

金属配位纳米粒是配位组装纳米药物的研究热点。金属离子和生物配体形成的化合物称之为生物配位化合物<sup>[4]</sup>。天然生物体中的大量蛋白质是基于整合金属离子和有机辅助因子的金属蛋白质。这些金属离子往往没有生物活性, 只有通过特定生物配体结合才能发挥出相应的活性和生理功能<sup>[4]</sup>。以血红蛋白为例, 血红蛋白的配位中心是 Fe (II), 其本身并没有生物活性, 在与卟啉环和蛋白链配体结合形成生物配位化合物血红蛋白后才能氧合发挥生物学活性和功能<sup>[5]</sup>。多种重要的金属蛋白中存在组氨酸残基和卟啉衍生物的协同配位<sup>[6]</sup>, 通过金属离子与金属蛋白的结合作用配位自组装形成多功能化的纳米粒, 已成为研究的热点<sup>[7-11]</sup>。锌是生物体所必需的微量元素之一, 不仅在细胞的 DNA 复制、RNA 转录和细胞增

殖分化进程中起着重要作用, 还参与蛋白质的调节、核酸的代谢和细胞凋亡等生命活动, 是维持身体正常发育重要元素<sup>[12,13]</sup>。锌离子是最常见的蛋白配位金属离子。有研究<sup>[14]</sup>表明, 锌离子通过损伤线粒体或激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶引起细胞氧化应激, 进而诱导细胞内活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 的生成损伤细胞。

由此, 本研究将负载光敏剂的功能化组氨酸序列与锌离子自组装配位, 拟设计出仿生金属纳米粒 (图 1)。在肿瘤高谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和低 pH 的条件下, 纳米粒被降解释放, 在激光照射下能够高效杀伤肿瘤细胞。这种基于咪唑基团和锌离子配位作用的仿生纳米材料具有良好的生物相容性, 可以延长纳米颗粒在血液循环中的滞留时间, 通过肿瘤高通透性和滞留效应更多地富集在肿瘤部位, 利用肿瘤微环境的独特性质释放光敏剂, 避免其在到达靶部位之前过早释放, 增强肿瘤光动力学治疗的效果<sup>[15]</sup>。

## 材料与方法

**主要仪器** 透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司); 激光共聚焦显微镜 (德国 ZEISS 公司); 纳米粒度仪 (日本 Malvern 公司); 荧光分光光度计 (日本 Simadazu 公司)。

**主要试剂** 氯化锌 (上海麦克林生化科技有限公司); 原卟啉 PpIX (上海源叶生物科技有限公司); 组氨酸 (上海吉尔生化有限公司); 三羟甲基氨基甲烷 Tris (上海起发实验试剂公司); Annexin V-FITC 凋亡试剂盒、MTT 细胞增殖与毒性检测试剂盒、MitoTracker Green、活性氧检测试剂盒 (中国碧云天公司); Hoechst 33342、single oxygen sensor green 试剂盒 (美国 Thermo 公司); LysoTracker Green、Dio 细胞膜绿色荧光探针 (中国上海翊圣公司)。

**氨基酸序列的制备** 采用多肽固相合成的方法合成了光敏剂组氨酸键合物, 用三氟乙酸:水:三异丙基

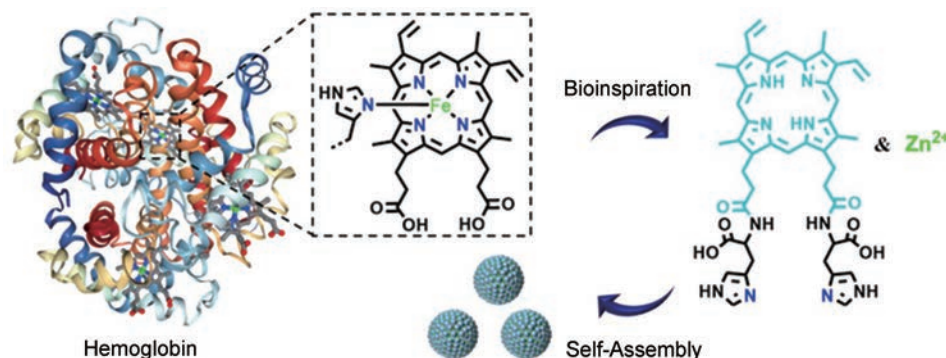


Figure 1 Schematic illustration of biomimetic metal nanoparticles

硅烷 (95%:2.5%:2.5%) 切落目标氨基酸序列。将切落液悬蒸浓缩, 浓缩液滴入冰乙醚沉出固体, 离心收集产物, 用乙醚超声洗涤再次离心收集产物, 重复3次, 将固体产物真空干燥。将该光敏剂组氨酸键合物命名为 PpIX-His。

**纳米粒的制备** 首先制备浓度分别为  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  氯化锌、 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸、 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris 和  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PpIX-His 的母液。取氯化锌母液  $900 \mu\text{L}$  和 PpIX-His 母液  $100 \mu\text{L}$  进行超声混合, 用 Tris 母液  $10 \mu\text{L}$  调节溶液 pH 为 7<sup>[7]</sup>。将上述溶液透析处理获得金属纳米粒 (NPs)。

**丁达尔现象的验证** 实验分为3组: 第1组是 NPs; 第2组是同浓度原卟啉的 PpIX-His 溶液和锌离子的混合溶液; 第3组是 Tris 调节 pH 为 7 的同浓度原卟啉的 PpIX-His 溶液。取上述溶液各  $1 \text{ mL}$ , 用红色激光照射溶液观察丁达尔现象。

**纳米粒的粒径和电势检测** 取 NPs  $100 \mu\text{L}$ , 用超纯水稀释至  $1 \text{ mL}$ , 检测纳米粒的粒径和聚合物分散性指数 (polymer dispersity index, PDI), 并测定纳米粒的 24 h 粒径稳定性。再取 NPs  $100 \mu\text{L}$ , 用超纯水稀释至  $1 \text{ mL}$ , 检测纳米粒的电势。

**透射电镜观察** 将 NPs 溶液用超纯水稀释至适宜浓度, 滴加至铜网上, 过夜干燥, 观察纳米药物粒径及形态。

**紫外表征** 将 NPs 溶液用 DMSO 稀释至  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 取  $1 \text{ mL}$  于比色皿中, 在波长  $300\sim 750 \text{ nm}$  处进行紫外表征, 同时比较  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PpIX-His 和  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PpIX 的紫外吸收特征。

**荧光表征** 将 NPs 溶液用超纯水稀释至  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 取  $1 \text{ mL}$  于比色皿中, 在波长  $450\sim 700 \text{ nm}$  处进行荧光检测, 同时比较  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PpIX-His 的荧光光谱。

**GSH 催化荧光恢复检测** 将 NPs 溶液用  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH 水溶液稀释至  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 取  $1 \text{ mL}$  于比色皿中, 在波长  $450\sim 700 \text{ nm}$  处进行荧光检测。每  $10 \text{ min}$  检测 1 次荧光恢复的情况。

**体外单线态氧  $^1\text{O}_2$  的检测** 利用 single oxygen sensor green 试剂盒检测 NPs 在体外激光激发下产生  $^1\text{O}_2$  情况, 其中 NPs、PpIX-His 和 PpIX 质量浓度分别为  $30$ 、 $30$  和  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 每隔  $10 \text{ s}$  检测在  $525 \text{ nm}$  处荧光强度变化。激发波长  $488 \text{ nm}$ , 激发光带宽:  $3 \text{ nm}$ ; 发射波长为  $480\sim 600 \text{ nm}$ , 发射光带宽:  $3 \text{ nm}$ 。激光功率:  $380 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。实验分为 SOSG 组、PpIX-His 组、NPs 组、PpIX+光照组、PpIX-His+光照组和 NPs+光照组。

**酸响应体外单线态氧  $^1\text{O}_2$  的检测** 利用 single oxygen sensor green 试剂盒检测在不同酸性条件下 NPs 产生  $^1\text{O}_2$  的能力, 将 NPs 分别用 pH 为  $5.0$ 、 $6.5$  和  $7.0$

的磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释至  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 每隔  $10 \text{ s}$  检测在  $525 \text{ nm}$  处荧光强度变化, 测定条件同上, 实验分为 pH  $5.0$  组、pH  $6.5$  组和 pH  $7.0$  组。

**细胞摄取实验** 本研究选用小鼠乳腺癌细胞 4T1 进行实验验证。将  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  NPs 分别与细胞孵育 2、6 和  $24 \text{ h}$  后, 吸除培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入新鲜培养基, 放置于激光共聚焦显微镜下观察。

**材料细胞摄取实验** 将终质量浓度为  $45$ 、 $45$  和  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 NPs、PpIX-His、PpIX 材料和细胞分别孵育  $6 \text{ h}$  后, 吸除培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入新鲜培养基, 放置于激光共聚焦显微镜下观察。实验分为空白组、PpIX 组、PpIX-His 组和 NPs 组。

**亚细胞器定位实验** 将  $45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  NPs 和 4T1 细胞孵育  $6 \text{ h}$  后, 吸除培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入分别含有 LysoTracker Green 溶酶体绿色荧光染料、Mito-Tracker Green 线粒体绿色荧光染料、Dio 细胞膜绿色荧光探针和 Hoechst 33342 细胞核染料的新鲜培养基中, 孵育相应时间后, 吸除培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入新鲜培养基, 放置于激光共聚焦显微镜下观察。

**MTT 法检测细胞活力实验** 将 4T1 细胞传代至 96 孔板  $12 \text{ h}$ , 待细胞贴壁且细胞密度适宜时, 按实验分组加入一系列浓度 ( $0$ 、 $0.5$ 、 $0.8$ 、 $1.2$ 、 $17$ 、 $2.6$ 、 $3.9$ 、 $5.9$ 、 $8.9$ 、 $13.3$  和  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的各组材料  $100 \mu\text{L}$ , 每个浓度设置 8 个平行样本 ( $n = 8$ )。实验分为 PpIX-His 组、PpIX-His+光照组、NPs 组和 NPs+光照组。孵育  $6 \text{ h}$  后, 光照组用激光 ( $29.8 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) 光照  $2 \text{ min}$ , 再放回细胞培养箱至  $24 \text{ h}$ , 加  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  MTT  $20 \mu\text{L}$ , 继续孵育  $4 \text{ h}$ , 吸除培养基, 加 DMSO  $150 \mu\text{L}$  震荡溶解  $10 \text{ min}$ , 用酶标仪检测  $570 \text{ nm}$  处的吸收度 ( $A$ ) 值。

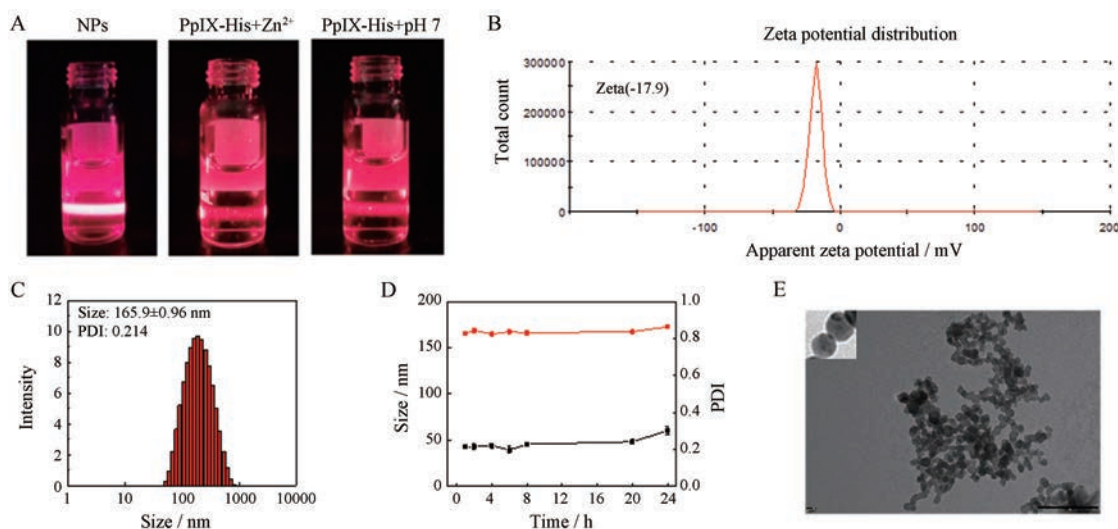
**活/死细胞双染评估细胞活力** 将质量浓度为  $25$ 、 $25$  和  $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 NPs、PpIX-His、PpIX 分别与 4T1 细胞孵育  $6 \text{ h}$  后, 吸除培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 按照活/死细胞双染色试剂盒说明书处理细胞染色  $20 \text{ min}$  后, 光照组分别用激光 ( $29.8 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) 光照  $30$  和  $60 \text{ s}$  后, 用激光共聚焦显微镜观察, 实验平行重复 3 次。实验分为空白组、PpIX-His 组、PpIX-His+ $30 \text{ s}$  光照组、PpIX-His+ $60 \text{ s}$  光照组、NPs 组、NPs+ $30 \text{ s}$  光照组和 NPs+ $60 \text{ s}$  光照组。

**统计学方法** 用 SPSS20.0 统计软件进行分析, 数据用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 结果

### 1 NPs 的结构性能表征

首先, 采用多肽固相合成的方法合成 PpIX-His, 考

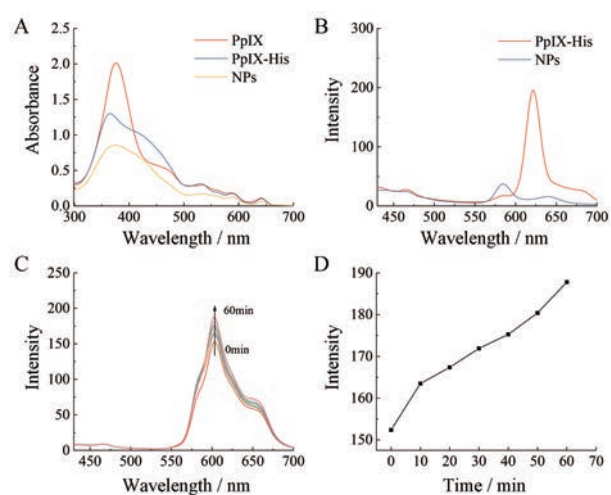


**Figure 2** Tyndall effect of NPs, PpIX-His+Zn<sup>2+</sup> and PpIX-His at pH 7.0 (A). Zeta potential of NPs (B). Hydrodynamic size distribution of NPs (C). The size and polymer dispersity index (PDI) changes of NPs in 24 h,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$  (D). Transmission electron microscope (TEM) image of NPs. Scale bar: 500 nm (E). PpIX-His: Protoporphyrin IX-histidine; NPs: PpIX-His self-assembled with Zn<sup>2+</sup> to obtain the biomimetic nanoparticles

察该键合物与 Zn<sup>2+</sup> 的配位组装性能。如图 2A 所示, 与 PpIX-His+Zn<sup>2+</sup> 组和 PpIX-His (pH 7) 对照组相比, NPs 组有明显的丁达尔现象, 由此可以初步判定纳米粒的形成, 进而验证了本研究通过金属与组氨酸配合形成仿生金属纳米粒的方法可行性。经粒径仪检测, 该金属纳米粒的 zeta 为 -17.9 mV、粒径约为 165 nm (图 2B、C)。与此同时, NPs 的粒径和 PDI 均在 24 h 内保持平稳状态, 说明该纳米材料具有良好的稳定性 (图 2D)。通过透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 可以观察到完整均一纳米粒的形成 (图 2E)。以上结果说明, 通过 PpIX-His 能与 Zn<sup>2+</sup> 自组装, 进而验证了作者通过仿生蛋白形成仿生纳米药物的设想。

## 2 NPs 的紫外表征和荧光表征

通过紫外光谱观察, PpIX 在 530、580 和 630 nm 处有特征吸收峰, 其中同一浓度下 NPs、PpIX-His 与 PpIX 的特征峰一致, 说明 NPs 具有光敏剂原卟啉的紫外吸收性质 (图 3A)。另外, 荧光光谱仪观察发现, 对照组 PpIX-His 水溶液在 630 nm 处的吸收值要明显强于 NPs 组 (图 3B)。其原因在于 PpIX-His 中的原卟啉处于游离状态, 在 630 nm 处可以检测出较强的吸收峰, 将 PpIX-His 和 Zn<sup>2+</sup> 配位形成仿生纳米粒后, 金属纳米粒中的原卟啉处于聚集状态, 光敏剂的荧光性能和 ROS 生成性能都被淬灭和抑制。为检测 NPs 在 GSH 条件下的响应能力, 利用荧光分光光度计检测 3 mmol·L<sup>-1</sup> GSH 条件下 NPs 的荧光恢复情况。如图 3C、D 所示, 加入 GSH 后 NPs 的荧光强度呈现出逐渐上升的趋势。由此推断, 该金属纳米粒可在肿瘤微环境高 GSH 条件

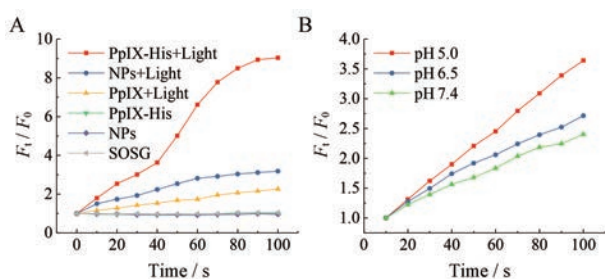


**Figure 3** UV-visible spectrophotometer of PpIX, PpIX-His, and NPs (A). Fluorescence spectra of PpIX-His and NPs (B). Fluorescence spectrum of NPs in glutathione (GSH) aqueous solution (C). Fluorescence changes of NPs in the presence of GSH (D)

下降解释放, 进而实现光动力学治疗能力增强。

## 3 体外产生单线态氧能力

通过 SOSG 试剂盒特异性检测 NPs 在激光照射下产生单线态氧 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 的能力。如图 4A 所示, 对比暗处理组, PpIX-His 和 NPs 在光照条件下都能产生单线态氧。因为游离原卟啉疏水性导致其在水性介质自淬灭, 所以在激光照射下 PpIX 组 SOSG 的荧光呈现相对较弱的变化。而 NPs 光照组的荧光变化则比较明显, 这是因为在光照条件下产生单线态氧使得 SOSG 的荧光强度逐渐增加。值得注意的是, PpIX-His 光照组呈

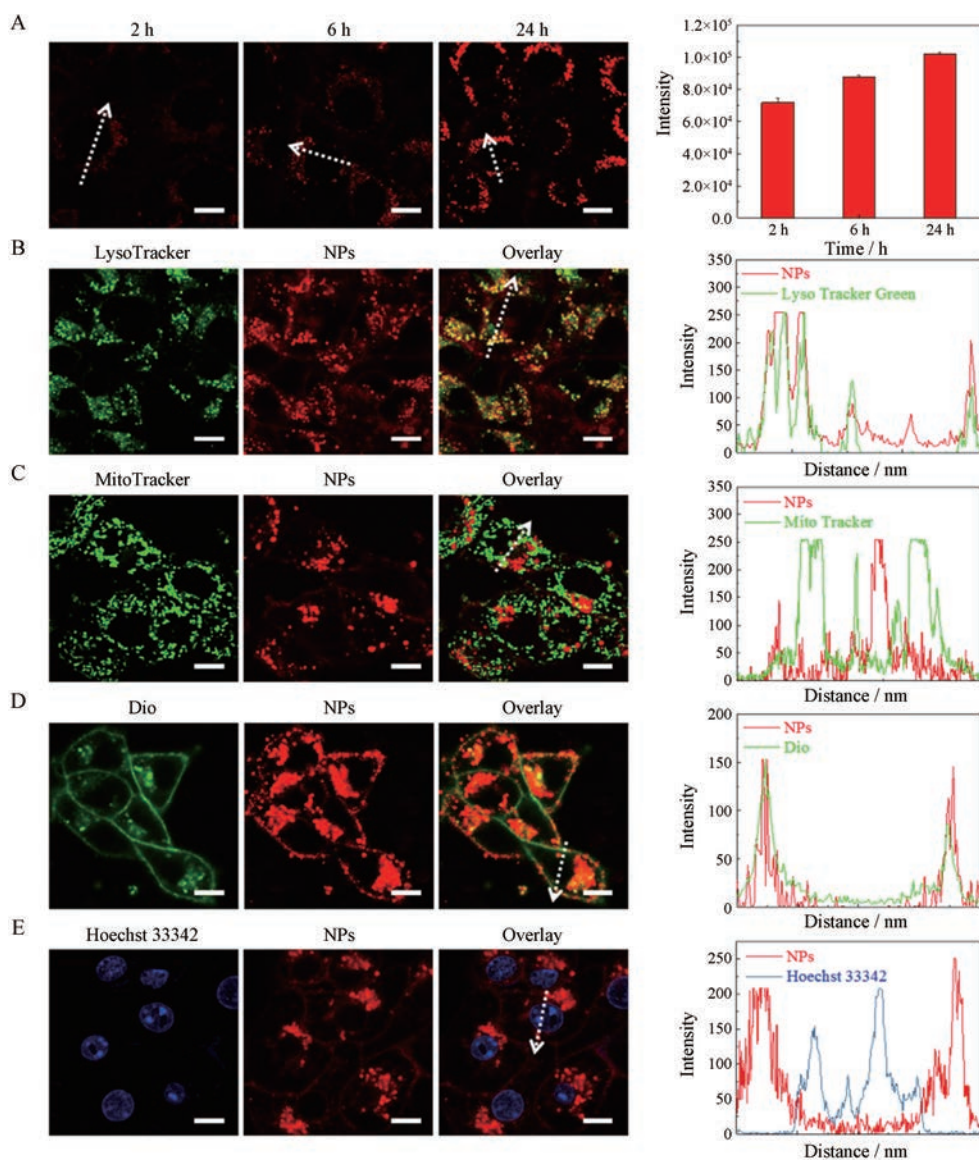


**Figure 4** Time related single oxygen sensor green (SOSG,  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) fluorescence changes ( $F_t/F_0$ ) of PpIX-His ( $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), NPs ( $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and equivalent concentration of PpIX in the presence and absence of light irradiation ( $380 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) (A). SOSG ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) fluorescence changes of NPs ( $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in different pH value (B)

现快速增长的趋势,这是由于PpIX-His中原卟啉处于相对游离的状态,未包封光敏剂产生单线态氧的能力要强于包封的形成纳米粒的NPs。与此同时,考察在不同酸性条件下NPs生成单线态氧的能力。如图4B所示,在酸性条件下NPs逐渐释放,从而验证了NPs肿瘤微酸环境响应激活光动力学治疗的应用潜能。

#### 4 溶酶体和细胞膜定位

本文考察了NPs亚细胞器分布的性能。首先,将NPs与4T1细胞共培养,分别孵育2、6和24 h。如图5A所示,随着共培养时间的增加,细胞中的红色荧光强度逐渐增强,验证了NPs时间依赖的内吞效果。为了考察NPs在细胞内的分布情况,分别选用了亚细胞



**Figure 5** Confocal laser scanning microscope (CLSM) images and the corresponding fluorescence profile analysis of 4T1 cells after treatment with NPs at the concentration of  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for 2, 6, 24 h (A).  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . The corresponding fluorescence profile analysis of 4T1 cells after treatment with NPs ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) for 6 h and stained by LysoTracker (B), MitoTracker (C), Dio (D), Hoechst 33342 (E). Scale bar:  $10 \mu\text{m}$

器染料示踪 NPs 在细胞内的位置分布。如图 5B 所示, LysoTracker Green 绿色荧光和 NPs 原卟啉的红色荧光存在很好的重合, 这说明金属纳米粒通过胞吞作用进入 4T1 细胞。同时, 也发现 NPs 的红色荧光与 Dio 的绿色荧光重合, 说明部分 NPs 锚定在细胞膜上, 这可能源于原卟啉对细胞膜的插膜作用, 与作者前期的研究结果相符<sup>[16]</sup>。而 NPs 的红色荧光与 MitoTracker Green 和 Hoechst 33342 并没有重合 (图 5C、E), 这提示该金属纳米粒并没有定位于线粒体和细胞核。

### 5 材料细胞摄取实验

进一步将 NPs、PpIX-His 和 PpIX 与 4T1 细胞共培养, 考察 NPs 细胞内吞的情况。如图 6 所示, PpIX 组的荧光强度明显较其他两组弱, 这是因为游离原卟啉具有较强的疏水性, 容易聚集沉降而不容易被细胞内吞。在同样条件下, 细胞内 PpIX-His 组的荧光强度要强于 NPs 组, 这是因为 NPs 主要通过细胞内吞的方式进入细胞。PpIX-His 以游离形式进出细胞, 进入细胞相对较快且含量大, 荧光强度高, 而形成纳米粒的 NPs 通过胞吞形式进入细胞内, 同一时间内进入细胞的含量相对较小, 但其肿瘤微环境响应释放仍可以观察到 NPs 组呈现出较强的荧光。

### 6 体外细胞毒性实验

利用小鼠乳腺癌细胞 (4T1 cells), 对比考察了 NPs 和 PpIX-His 的光动力学治疗潜能。如图 7 所示, MTT 结果表明, NPs 组的暗毒性要明显小于 PpIX-His 组, 当材料质量浓度同为  $3.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, PpIX-His 组的细胞存活率约为 78%, 而 NPs 组则趋向于 100%。这凸显出金属纳米粒相对于游离 PpIX-His 的优越性, 有效地克服了光敏剂的不良反应。联合上述细胞内吞实验和亚细胞器分布实验结果综合分析结果表明, 在同一时间内, PpIX-His 组进入细胞的含量较 NPs 组多, 且 PpIX-His 中的光敏剂原卟啉处于相对游离的状态, PpIX-His

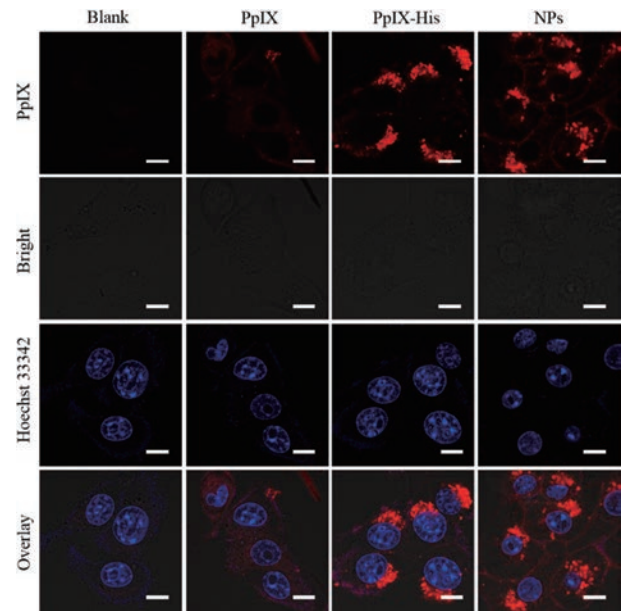


Figure 6 CLSM images of 4T1 cells treated with PpIX, PpIX-His, NPs. Scale bar:  $10 \mu\text{m}$

呈现较大的光毒性。随着给药浓度的增加, NPs 组的光动力学治疗性能毒性逐渐增加, 达到与 PpIX-His 近乎相似的细胞毒性, 这可能是高浓度条件下细胞对 NPs 内吞增强引起的。

### 7 活/死细胞双染实验

利用活细胞/死细胞双染试剂盒, 进一步探讨 NPs 的细胞毒性。钙黄绿素-AM (Calcein-AM) 具有细胞渗透性, 常作为活细胞染色的荧光探针, 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 常作为坏死细胞的指标。如图 8 所示, 与空白组相同, NPs 和 PpIX-His 组的暗处理组表现出很强的绿色荧光和微弱的可忽略不计的红色荧光, 但是经过光照处理后绿色荧光渐弱而红色荧光增强, 提示光照处理后出现细胞坏死。在此实验中设置了两个光照时间长度 30 和 60 s, 随着光照时间的增长,

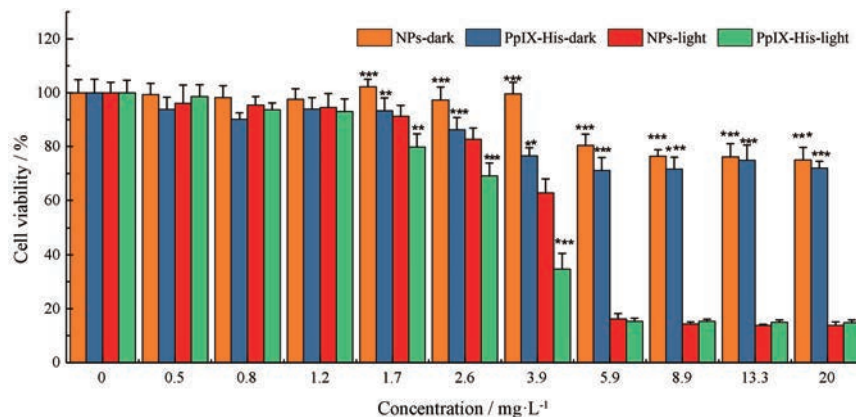
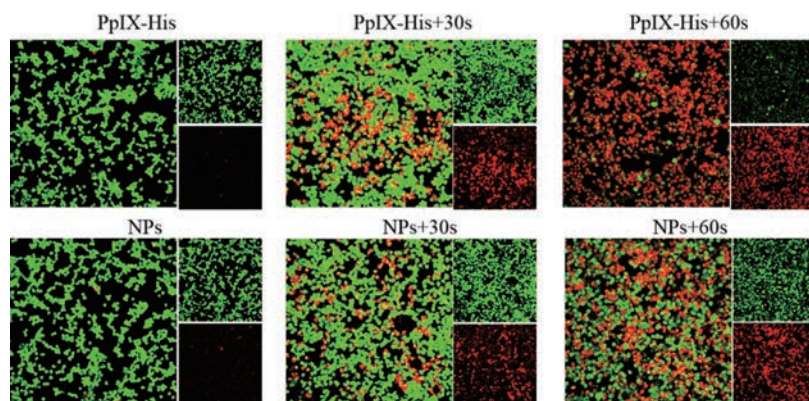


Figure 7 Anti-proliferation ability of PpIX-His and NPs. Cytotoxicity of PpIX-His and NPs with or without light against 4T1 cells.  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs NPs-light group



**Figure 8** CLSM images of 4T1 cells after treatment with PpIX-His and NPs in the absence of light irradiation or under light irradiation for 30 s or 60 s and stained by Calcein-AM/PI. PI: Propidium iodide

红色荧光逐渐增强, 细胞坏死数量逐渐增多, 这体现了光动力学治疗的可控性和优越性。对比同条件下 NPs 和 PpIX-His 组, PpIX-His 坏死程度要大于 NPs 组, 这也验证了上述分析, PpIX-His 以游离形式进入细胞, 且 PpIX-His 中的光敏剂原卟啉处于相对游离的状态, 因而细胞坏死程度大于 NPs 组。

## 讨论

血红蛋白是生物体中最常见的也是最具有代表性的金属蛋白, 铁既是活性中心也是配位中心, 铁不仅与蛋白质相连, 还与卟啉相连接<sup>[4]</sup>。由此本研究设计了一条负载光敏剂的氨基酸序列, 将其与锌离子配位, 自组装配位形成仿生金属纳米粒。该仿生金属纳米粒具有清晰的纳米结构, 均匀的尺寸分布, 良好的稳定性, 并且具有肿瘤微环境响应释放特性, 在肿瘤高 GSH 和低 pH 值的条件下, 纳米粒被降解释放, 在激光照射下高效杀伤肿瘤细胞。与现有的纳米药物比较, 该仿生金属纳米粒存在以下优势: 首先, 基于仿生金属蛋白的设计该金属纳米粒通过咪唑基团和锌离子的配位作用能够形成均一稳定的纳米粒。其次, 该金属纳米粒具有肿瘤微环境高 GSH 和低 pH 值响应特性, 能够降低对非靶点部位的毒副作用。更为重要的是, 合成该金属纳米粒的各个组分均是生物良性材料, 这赋予了该金属纳米粒良好的生物相容性。本研究中基于组氨酸和锌离子配位的仿生金属纳米粒能够有效抑制肿瘤细胞活性, 促进细胞凋亡, 该组装配位策略可为开发新型智能纳米药物提供新的思路。

**作者贡献:** 郑蓉蓉提出选题、设计实验、实施研究、采集/整理/分析数据、起草论文; 赵林平实施研究、采集/整理数据、统计分析; 陈华清实施研究、分析数据、统计分析; 李仕颖设计框架、修订论文、终审论文; 余细勇修订论文、终审论文、指

导性支持。

**利益冲突:** 除基金项目支持外, 本文全体作者未接受第三方的资助或服务, 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 380-387.
- [2] Li SY, Cheng H, Qiu WX, et al. Cancer cell membrane-coated biomimetic platform for tumor targeted photodynamic therapy and hypoxia-amplified bioreductive therapy [J]. *Biomaterials*, 2017, 142: 149-161.
- [3] Li SY, Cheng H, Xie BR, et al. Cancer cell membrane camouflaged cascade bioreactor for cancer targeted starvation and photodynamic therapy [J]. *ACS Nano*, 2017, 11: 7006-7018.
- [4] Wang K. Object of bioinorganic chemistry research [J]. *J Mol Sci (分子科学学报)*, 1982, 16: 133-138.
- [5] Li SK, Zou QL, Li YX, et al. Smart peptide-based supramolecular photodynamic metallo-nanodrugs designed by multicomponent coordination self-assembly [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 10794-10802.
- [6] Paoli M, Liddington R, Tame J, et al. Crystal structure of T state hemoglobin with oxygen bound at all four haems [J]. *J Mol Biol*, 1996, 256: 775-792.
- [7] Zhao LY, Liu YM, Chang R, et al. Supramolecular photothermal nanomaterials as an emerging paradigm toward precision cancer therapy [J]. *Adv Funct Mater*, 2019, 29: 1806877.
- [8] Li SK, Zou QL, Yuan CQ, et al. Amino acid coordination driven self-assembly for enhancing both the biological stability and tumor accumulation of curcumin [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57: 17084-17088.
- [9] Xing RR, Zou QL, Yuan CQ, et al. Self-assembling endogenous biliverdin as a versatile near-infrared photothermal nanoagent for cancer theranostics [J]. *Adv Mater*, 2019, 31: 1900822.
- [10] Chu CC, Ren E, Zhang YM, et al. Zinc (II) - dipicolylamine coordination nanotheranostics: toward synergistic nanomedicine by

- combined photo/gene therapy [J]. *Angew Chem*, 2019, 131: 275-278.
- [11] Chu CC, Su M, Zhu J, et al. Metal-organic framework nanoparticle-based biomineralization: a new strategy toward cancer treatment [J]. *Theranostics*, 2019, 9: 3134-3149.
- [12] Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection [J]. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68: 447S- 463S .
- [13] Ren GD, Qin SJ. The role of zinc in cell metabolism [J]. *J Foreign Med Sci (Section of Medgeography)* (国外医学杂志医学地理分册), 2008, 99: 102-107.
- [14] Fang YL, Yin J, Liu KJ, et al. Interaction between free radicals and zinc following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *J Capital Med Univ* (首都医科大学学报), 2018, 39: 373-377.
- [15] Zhang BB, Huang WL, Mei YY, et al. Smart fluorescent nano-delivery system for breast cancer cell tracing and growth inhibition [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2019, 54: 1123-1131.
- [16] Cheng H, Zheng RR, Fan GL, et al. Mitochondria and plasma membrane dual-targeted chimeric peptide for single-agent synergistic photodynamic therapy [J]. *Biomaterials*, 2019, 188: 1-11.