多功能 MnO_2/GNPs@5-FU 纳米材料用于肿瘤微环境响应性药物递送与增强化学动力学治疗的协同治疗策略

王玖阳, 王德升, 成日青, 郭慧卿, 塔　娜, 齐和日玛*, 徐长进*

(内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110)

摘要: 为实现肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 响应的精准药物递送, 本研究设计并构建了一种多功能的纳米治疗体系。该系统以球形二氧化锰 (MnO_2) 为内核, 通过负载金纳米粒子 (Au nanoparticles, GNPs) 和化疗药物 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU), 成功整合了 GNPs 的近红外光热效应以及 MnO_2 对高浓度谷胱甘肽和酸性 pH 的响应特性, 实现了多重刺激下的药物按需释放。实验结果表明, 所构建的 MnO_2/GNPs@5-FU 纳米系统具有高载药量、优异的光热转换效率和显著的 TME 依赖的药物释放行为。体外细胞实验结果表明, 该体系通过 MnO_2 介导的化学动力学治疗与 5-FU 的化疗相结合, 对 4T1 肿瘤细胞产生了高效的协同杀伤效果。本研究为开发用于肿瘤靶向治疗的智能纳米药物递送平台提供了初步的体外实验依据与新的思路。

关键词: MnO_2; 肿瘤微环境; 协同治疗; 药物递送; 多功能纳米平台

中图分类号: R943　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870(2026)05-1830-11

A synergistic therapeutic strategy based on multifunctional MnO_2/GNPs@5-FU nanomaterial for tumor microenvironment-responsive drug delivery and enhanced chemodynamic therapy

WANG Jiu-yang, WANG De-sheng, CHENG Ri-qing, GUO Hui-qing, TANA, QIHERIMA*, XU Chang-jin*

(*School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China*)

Abstract: To achieve precise drug delivery responsive to the tumor microenvironment (TME), this study designed and constructed a multifunctional nanotherapeutic system. The system employs spherical manganese dioxide (MnO_2) as the core, which is loaded with gold nanoparticles (Au nanoparticles, GNPs) and the chemotherapeutic drug 5-fluorouracil (5-FU). It successfully integrates the near-infrared photothermal effect of GNPs and the responsiveness of MnO_2 to high glutathione concentration and acidic pH, enabling on-demand drug release under multiple stimuli. Experimental results demonstrate that the as-constructed MnO_2/GNPs@5-FU nano-system exhibits high drug loading capacity, excellent photothermal conversion efficiency, and remarkable TME-dependent drug release behavior. *In vitro* cell experiments demonstrated that the system, by combining MnO_2-mediated chemodynamic therapy and 5-FU chemotherapy, achieved a highly efficient synergistic killing effect against 4T1 tumor cells. This study provides preliminary *in vitro* experimental evidence and novel insights for the development of intelligent nanodrug delivery platforms for tumor-targeted therapy.

Key words: MnO_2; tumor microenvironment; synergistic therapy; drug delivery; multifunctional nanoplatform

收稿日期: 2025-11-19;　修回日期: 2025-12-17.

基金项目: 内蒙古自然科学基金资助项目 (2024QN05006, 2025MS08046); 内蒙古医科大学面上项目 (YKD2023MS082).

*通讯作者 E-mail: qiherima@immu.edu.cn; changjin.xu@immu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1085

肿瘤微环境作为药物控制释放领域中的关键触发因素, 对智能响应型纳米载体的设计具有重要意义[1]。众所周知, 肿瘤微环境具有一系列典型特征, 包括高浓度谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、过量表达的H_2O_2、酸性条件及缺氧状态等[2-5], 这些因素显著影响了许多传统化疗药物的治疗效果[6]。GSH作为参与多种生理过程的必需物质, 在肿瘤细胞中的浓度通常可达0.01 mol·L^{-1}, 较正常细胞高出至少8～10倍且细胞内GSH浓度也远高于细胞外液, 差异可达100～1 000倍[7]。基于这一特性, GSH已成为触发抗癌药物从纳米载体中释放的重要信号分子。

近年来, 二氧化锰 (MnO_2) 纳米材料因其在化疗[8]、放疗、光动力治疗[9]及肿瘤微环境调控[10]等方面的潜在应用而受到广泛关注[11]。MnO_2不仅可与GSH和/或H^+发生反应, 降解为水溶性Mn^{2+}离子, 且表现出良好的生物安全性, 无长期毒性[12-14]; 此外, 它还能催化H_2O_2的分解, 从而抑制肿瘤转移[15]。然而, 目前已报道的MnO_2纳米结构多为纳米片形式, 常需与其他纳米粒子组装成复合材料[16], 这一形态限制了其进一步功能化修饰, 也未能充分发挥其应用潜力。相比之下, 球形结构的纳米材料凭借其高载药空间和可控释放性能, 在药物递送系统中展现出显著优势[17]。因此, 开发一种可功能化修饰的球形MnO_2纳米载体具有重要的研究意义。

为进一步提高肿瘤治疗效率并克服单一疗法的局限性, 研究者引入了具有协同增强效应的金纳米粒子 (Au nanoparticles, GNPs), 以实现化疗、光热治疗与光动力治疗的协同组合。GNPs凭借其独特的尺寸效应与优异的光热转换能力, 可作为高度局域化的热源, 广泛应用于药物递送、光热治疗及生物成像等领域[18-22]。

本研究设计了一种球形结构的MnO_2/GNPs复合材料, 用于负载5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU)。该载体可在肿瘤微环境高GSH和酸性条件下发生降解, 实现药物的靶向释放, 并表现出显著的肿瘤细胞杀伤效果。在近红外激光照射下, 负载的GNPs可高效将光能转化为热能, 进一步协同增强治疗效果。本研究不仅提出了一种创新的多响应药物纳米载体制备策略, 还系统评价了其光热性能与多重响应释药行为。结果表明, 所构建的MnO_2/GNPs@5-FU系统具备高载药效率、优异的光热转换性能、多环境响应特性及可控降解能力, 为智能药物控释系统的开发提供了新思路。

材料与方法

试剂 高锰酸钾 (≥ 99.5%, B23121406)、盐酸 (分析纯, 38%, 220430) 购自天津市风船化学试剂科技有限公司; PBS磷酸盐缓冲液 (pH 5.0, 08525884ZT, 北京兰杰柯科技有限公司); PBS磷酸盐缓冲液 (pH 6.5)、PBS磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)、5-氟尿嘧啶 (98%, S17073) 购自上海原叶生物科技有限公司; 甲醇 (色谱级, 99.9%, 210386, 赛默飞世尔科技公司); 亚甲基蓝 (≥ 99.5%, C17080939)、5,5′-二硫代双-(2-硝基苯甲酸) (≥ 99%, C17276393) 购自山东科源生化有限公司; 碳酸氢钠 (分析纯, 99.5%, 天津市鑫铂特化工有限公司); 过氧化氢 (3%, H792073, 上海麦克林生化科技有限公司); 谷胱甘肽 (> 98%, CG34192360, 北京酷莱搏科技有限公司); $HAuCl_4$ (分析纯, 20211009, 国药集团化学试剂有限公司); 胎牛血清 (FBS defined, 24DO1000)、4T1细胞、人脐静脉内皮细胞 (Huvec)、1640培养基、细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 购自赛文创新生物科技有限公司。

仪器 X射线衍射仪 (Sartlab, 日本理学Rigaku公司); 傅里叶变换红外光谱仪 (Nicolet iS50, 美国赛默飞公司); 氮气吸附脱附仪 (Microscope Autosorb-TriStar II, 美国麦克仪器公司); 场发射扫描电子显微镜 (JSM-7001F, 日本电子株式会社JEOL公司); 透射电子显微镜 (JEM-2100F日本电子株式会社JEOL公司); 高效液相色谱仪 (LC-2030C 3D, SHIMADZU); 色谱柱 (SHIMSEN Superb IIC18, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 紫外–分光光度计 (P9, 上海美谱达仪器有限公司); 酶标仪 (INFINITE M NANO, 瑞士帝肯TECAN); 管式炉 (OTF-1200X-S, 合肥科晶材料技术有限公司); 恒温培养摇床 (THZ-300C, 上海恒科学仪器有限公司)。

花球状MnO_2纳米材料制备 采用一步水热法合成由纳米片组装的花球状MnO_2纳米材料。首先, 将8 mmol $KMnO_4$完全溶解于120 mL去离子水中, 在磁力搅拌下, 缓慢滴加质量浓度为12 mol·L^{-1}的HCl溶液, 控制$KMnO_4$与HCl的摩尔比为1∶10。滴加完毕后继续搅拌20 min以确保溶液混合均匀。随后, 将混合溶液转移至200 mL聚四氟乙烯内衬的水热反应釜中, 密封后于120 ℃反应1 h。反应结束后待体系自然冷却至室温, 通过离心收集沉淀产物, 并依次使用去离子水和无水乙醇分别洗涤3次, 最终在60 ℃条件下真空干燥12 h, 获得由纳米片组装的花球状MnO_2纳米材料。

MnO_2/GNPs材料制备 采用浸渍–还原法制备金纳米颗粒负载的MnO_2复合材料 (MnO_2/GNPs), 流程如图1所示。首先, 将0.1 g预先合成的MnO_2纳米材料分散于50 mL无水乙醇中, 室温下磁力搅拌1 h使其均匀分散。随后, 为达到2%的理论负载量, 在持续搅拌下加入400 μL质量浓度为0.01 g·mL^{-1}的$HAuCl_4$溶

液, 继续搅拌 1 h 以确保金前驱体充分吸附。接着, 将上述混合溶液于 80 ℃下鼓风干燥 12 h, 得到前驱体粉末。最后, 将上述前驱体粉末置于管式炉中, 在流速为 80 mL·min^{-1} 的 H_2/Ar 混合气体 (10% H_2, *v*/*v*) 氛围下, 以 5 ℃·min^{-1} 的升温速率加热至 300 ℃, 并保温 2 h。反应结束后, 样品在 H_2/Ar 混合气氛下自然冷却至室温, 获得球形 MnO_2/GNPs 纳米复合材料。电感耦合等离子体 (ICP) 定量分析显示, GNPs 的实际负载量为 3%。

MnO_2/GNPs@5-FU 载药材料制备 准确称取 5-FU, 采用甲醇−水混合溶液 (体积比 10∶90) 作为溶剂, 经超声辅助溶解, 配制成质量浓度为 2.5 mg·mL^{-1} 的 5-FU 溶液。随后, 将 MnO_2/GNPs 纳米复合材料按特定质量比分散于上述溶液中, 在恒定转速下磁力搅拌 1 h, 使载体材料与药物分子充分相互作用, 最终制得 MnO_2/GNPs@5-FU 载药体系。

材料表征 采用粉末 X 射线衍射 (powder X-ray diffraction, XRD) 对所制备 MnO_2 纳米材料的晶体结构进行表征, 以确定其物相组成。利用场发射扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 和透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察样品的微观形貌、尺寸分布及表面结构特征。通过氮气吸附−脱附实验, 基于 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 方法计算样品的比表面积, 并采用 Barrett-Joyner-Halenda (BJH) 模型分析孔径分布, 以系统评估材料的孔隙结构特性。此外, 采用傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 对材料进行化学结构表征, 通过特征吸收峰识别表面官能团与化学键类型, 从而明确其化学组成与结构信息。

MnO_2/GNPs 材料的载药性能测试 采用浸渍法将模型药物 5-FU 负载于 MnO_2/GNPs 材料表面。首先, 将精确称取的 5-FU 溶解于 10 mL 流动相中, 搅拌至完全溶解; 随后加入定量的 MnO_2/GNPs 复合材料, 并通过超声处理使其在药液中均匀分散。为监测药物吸附动力学, 于不同时间间隔取样 1 mL 反应液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 采用高效液相色谱法 (HPLC) 在 265 nm 波长下测定滤液中 5-FU 的浓度。吸附完成后, 将剩余混合物离心, 收集固体沉淀, 经真空干燥处理, 获得 5-FU 负载的 MnO_2/GNPs 载药体系。根据公式 (1) 计算负载率, 定量评估 MnO_2/GNPs 载体对 5-FU 的负载能力。

$$DL\,(\%) = (W - W_0)/W_1 \times 100\% \quad (1)$$

其中, W 为初始加入 5-FU 药物的总质量, W_0 为上清液中 5-FU 药物的质量, W_1 为最终载体及其负载药物的总质量。

MnO_2/GNPs 材料释药性能测试 采用动态透析法考察载药复合材料在不同 pH 环境中的药物释放特性。将适量载药材料密封于截留分子质量为 5 000 Da 的透析袋中, 并注入相应 pH 的释放介质。随后, 将透析袋置于含 13 mL 磷酸盐缓冲液 (0.01 mol·L^{-1}, pH 分别为 7.4、6.5 和 5.0) 的烧杯中, 构建体外释放体系。整个系统在 37 ± 0.5 ℃、100 r·min^{-1} 的恒温振荡条件下持续孵育, 以模拟体内环境。在预设时间点采集 1 mL 释放介质, 并同时补加相同温度、相同 pH 的等体积新鲜缓冲液。取样经 0.22 μm 滤膜过滤后, 采用 HPLC 在 265 nm 波长下测定 5-FU 的浓度, 并根据公式 (2) 计算累积释放率, 以评价不同 pH 条件下药物的释放动力学行为。

$$E\,(\%) = \frac{C_n \times V + \sum_1^{n-1} C_k \times V_0}{m} \times 100\% \quad (2)$$

其中, E 表示药物累积释放率; C_n 表示 n 时释放介质中 5-FU 的质量浓度 (μg·mL^{-1}); V 为释放介质溶液的总体积; C_k 表示在 k 时间点释放介质中的药物质量浓

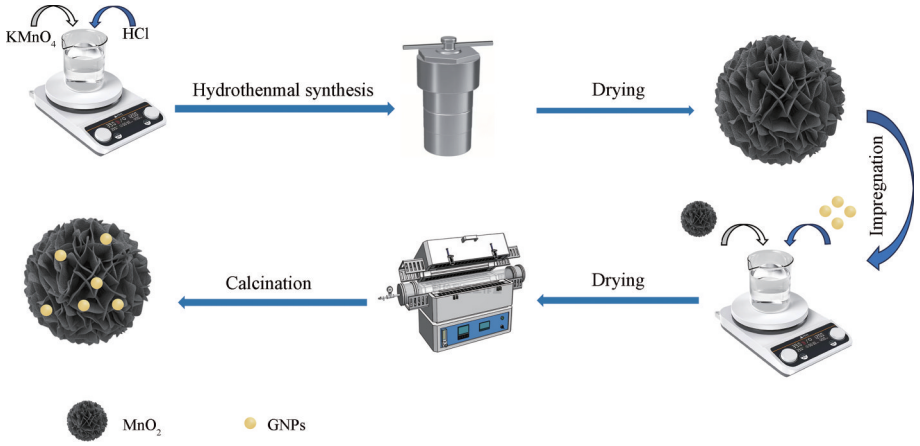


Figure 1 Scheme for preparation of MnO_2/GNPs materials. GNPs: Au nanoparticles; MnO_2/GNPs: MnO_2-supported Au nanoparticle composite

度; V_0为每次取样的体积; n为取样次数。

MnO_2/GNPs材料光热转换性能测试 采用808 nm近红外激光, 系统评估了MnO_2/GNPs复合材料的光热性能。首先, 在固定材料浓度下, 分别以0.5、1.5和2.5 W·cm^{-2}的功率密度进行照射, 考察升温行为与功率的依赖性。随后, 在2.5 W·cm^{-2}的辐照条件下, 测定不同浓度样品的光热升温曲线。为评价光热稳定性, 在恒定功率与浓度下进行4次循环升降温实验, 并基于该数据计算材料的光热转换效率。

MnO_2/GNPs材料活性氧产生能力检测 以亚甲基蓝(methylene blue, MB)作为特异性底物用于检测羟基自由基(·OH)的生成。在实验中, 向含MnO_2/GNPs (100 μg·mL^{-1})的$NaHCO_3$缓冲溶液(25 mmol·L^{-1})中加入一定体积的MB (0.1 mmol·L^{-1})和H_2O_2 (5 mmol·L^{-1}), 使最终体系体积为0.5 mL。将混合液于37 ℃孵育30 min后, 使用紫外−可见分光光度计测定665 nm处的吸光度值。

MnO_2/GNPs材料GSH消耗能力检测 为了进一步研究体外GSH消耗的能力, 将不同浓度的MnO_2/GNPs与GSH混合不同时间(0、1、3、8、12、24 h)后, 使用5,5′-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)(5,5′-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB)作为探针检测残留的GSH。通过紫外−可见分光光度计在412 nm处记录DTNB与GSH的硫醇基团(-SH)反应产生的黄色产物。

细胞培养 实验中使用的乳腺癌细胞(4T1)及人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, Huvec)于37 ℃、5% CO_2无菌培养箱中培养, 所有耗材均为一次性无菌产品。完全培养基的组成为: 90% RPMI-1640基础培养基、10%胎牛血清(fetal bovine serum , FBS)及1%青霉素−链霉素双抗溶液。

体外细胞毒性实验 通过CCK-8测定评估MnO_2/GNPs材料体外细胞毒性。首先, 将4T1细胞以合适密度接种于96孔板中培养12 h使细胞充分贴壁, 吸除原培养基, 加入用完全培养基配制的不同质量浓度的5-FU、MnO_2/GNPs和MnO_2/GNPs@5-FU溶液(5、10、20、40、60、100、150 μg·mL^{-1}), 孵育24 h以检测不同培养时长的毒性。

4T1细胞的活性检测 将4T1细胞均匀接种于96孔板中, 待贴壁后随机分为以下6组: ① 单纳米材料组: MnO_2/GNPs; ② 药物治疗组: 100 μmol·L^{-1} H_2O_2 + 5-FU; ③ CDT-纳米材料载药组: 100 μmol·L^{-1} H_2O_2 + MnO_2/GNPs@5-FU; ④ 化学动力学治疗: 100 μmol·L^{-1} H_2O_2 + MnO_2/GNPs; ⑤ 纳米材料载药组: MnO_2/GNPs@5-FU; ⑥ 单药组: 5-FU, 各组的5-FU、MnO_2/GNPs和MnO_2/GNPs@5-FU浓度梯度与前述毒性评估一致。

细胞贴壁后, 按上述分组进行24 h处理。培养结束后, 每孔加入10%体积的CCK-8试剂避光孵育2 h, 用酶标仪测定450 nm处的吸光度(A)值, 并计算细胞存活率。此外, 还通过CCK-8法测定评估MnO_2/GNPs@5-FU对Huvec的体外毒性作用, 其余步骤与4T1实验相同。根据公式(3)计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率 (\%)} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}})/(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\% \quad (3)$$

Calcein AM/PI细胞染色实验 采用活/死细胞染色法评价MnO_2/GNPs对4T1细胞增殖的抑制作用。具体操作如下: 将4T1细胞以每孔5×10^{3}个细胞的密度接种于96孔板中, 在37 ℃孵育过夜; 待细胞贴壁后弃去培养基, 并用PBS洗涤两次。按以下处理组进行培养: ① 空白对照; ② MnO_2/GNPs (I) (质量浓度5 μg·mL^{-1}); ③ MnO_2/GNPs (II) (质量浓度150 μg·mL^{-1})。各组在37 ℃孵育12 h, 孵育结束后弃去培养基, 并用PBS轻轻洗涤两次。随后每孔加入100 μL新配的Calcein AM/PI工作液, 于室温避光孵育30 min。最后在避光条件下用共聚焦显微镜观察并拍照记录细胞染色情况。

溶血实验 通过体外溶血实验评价MnO_2/GNPs的血液相容性。自小鼠获取的新鲜抗凝血样, 首先在4 ℃条件下以1 500 r·min^{-1}离心5 min, 分离红细胞, 并采用无菌PBS进行3次洗涤以充分去除血浆。经洗涤的红细胞最终被重悬于生理盐水中, 配置成2%的实验用悬液。在测试过程中, 将200 μL红细胞悬液与800 μL含有梯度浓度MnO_2/GNPs的生理盐水溶液共同孵育(37 ℃、1 h)。孵育结束后, 反应体系经3 500 r·min^{-1}离心5 min, 使用酶标仪测定上清液在540 nm波长处的吸光度, 以定量分析血红蛋白的释放量, 从而判定材料的溶血性。

细胞内腺苷三磷酸和GSH检测 为检测细胞内腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)与GSH水平, 将4T1细胞以每孔2×10^{5}个细胞的密度接种于12孔板, 培养12 h后, 分别给予不同浓度制剂处理24 h。收集细胞, 经相应裂解液裂解、离心后, 取上清液分别使用ATP试剂盒(Beyotime)和Elman试剂(Solarbio)测定ATP及GSH含量, 并通过BCA法测定蛋白浓度对结果进行标准化。

结果与讨论

1 纳米材料的结构和表面性质

采用XRD对合成的MnO_2纳米材料及其载药复合物MnO_2/GNPs@5-FU的晶体结构进行表征(图2A), 水热法制备的MnO_2样品衍射峰与标准卡片(JCPDS

No. 00-012-0716) 完全一致, 表明结晶良好的MnO_2已成功合成。进一步分析MnO_2/GNPs@5-FU复合材料的XRD谱图发现, 经300 ℃ H_2焙烧处理后, 其衍射峰明显窄化、强度增强, 峰形更为尖锐, 说明材料结晶性显著提升。值得注意的是, 复合材料中仅检测到MnO_2的特征衍射峰, 并未观察到5-FU或Au物种的明显信号, 表明5-FU分子与金纳米粒子均以高度分散的状态存在于MnO_2载体表面, 未发生明显的晶体团聚。

通过SEM和TEM对材料的微观形貌、结构及元素分布进行系统表征 (图2B～E)。SEM图像 (图2B) 显示, 所制备的MnO_2呈现出由纳米片自组装形成的规则球形结构, 尺寸分布均一, 平均粒径约为3 μm。TEM结果 (图2C) 进一步确认该球形结构由纳米片交织组装而成, 形貌完整、结构清晰。对于MnO_2/GNPs@5-FU复合材料, TEM图像显示其仍保持球形整体形貌, 但表面纳米片结构转变为颗粒状形态 (图2D)。值得注意的是, 复合材料的粒径较纯MnO_2载体有所减小, 由约3降低至1 μm这可能是由于高温处理过程中部分结构收缩或重构所致。尽管粒径减小有助于通过增强渗透与滞留 (EPR) 效应提升肿瘤组织富集, 但1 μm的尺寸对于全身给药而言仍面临分布挑战。因此, 在后续的体内研究中将采用原位注射的给药策略。该方案不仅能有效克服大尺寸颗粒的体内分布难题, 还可实现药物在肿瘤部位的局部高浓度富集, 从而更高效地发挥其协同治疗作用。进一步借助高角环形暗场扫描透射电子显微镜 (HAADF-STEM) 及元素面分布分析 (图2E) 可见, Au元素在MnO_2载体表面均匀分布, 说明GNPs分散良好; 同时, N、F与O元素均一分布, 证实5-FU已成功负载并在复合材料中均匀分散, 从而验证了该纳米药物递送系统的成功构建。

为系统评估材料的孔结构特性, 采用氮气吸附−脱附法对系列样品进行了表征分析。如图3A所示, MnO_2/GNPs复合材料表现出典型的IV型等温吸脱附曲线, 并在相对压力 (P/P_0) 0.7～1.0内呈现H3型滞后回环, 符合IUPAC关于狭缝状介孔结构分类特征, 表明材料中存在由纳米粒子堆积形成的介孔结构[23]。BET比表面积测试结果显示, MnO_2/GNPs具有较高的比表面积 (103.2 $m^2 \cdot g^{-1}$), 这为药物分子提供了丰富的

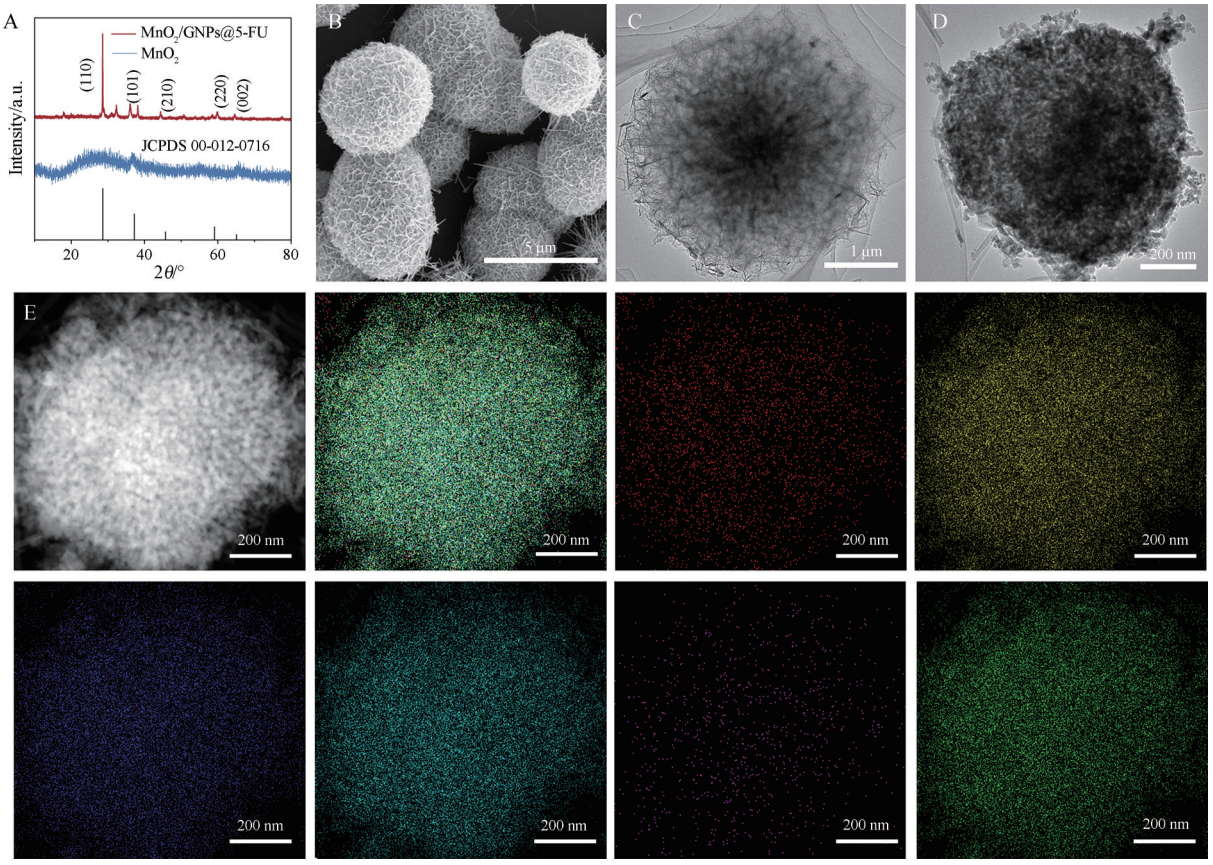


Figure 2 Textural and structural characterization of the as-prepared materials. A: Powder X-ray diffraction (XRD) pattern of the MnO_2 material; B: Scanning electron microscope (SEM) image of MnO_2; C: Transmission electron microscope (TEM) image of MnO_2/GNPs; D: TEM image of MnO_2/GNPs@5-FU; E: HAADF-STEM image and corresponding TEM-EDX elemental mapping images of MnO_2/GNPs@5-FU

锚定位点, 有助于提高载药能力。进一步通过BJH模型分析孔径分布 (图3A), 结果表明材料以介孔为主, 孔径集中分布于25 nm左右。这种开放的孔道结构不仅有利于5-FU分子的扩散与嵌入, 还可促进其在释放介质中的传输, 显示出该材料在药物递送系统中良好的应用潜力。

为明确材料表面化学组成并验证药物负载效果, 采用FTIR对MnO_2/GNPs及其载药复合物MnO_2/GNPs@5-FU进行了分析 (图3B)。两种材料在3 435 cm^{-1}左右均出现宽而强的吸收峰, 该峰归属于材料表面吸附水分子中O-H键的伸缩振动, 表明材料表面具有一定的亲水性[24]。值得注意的是, 在载药样品MnO_2/GNPs@5-FU的红外谱图中, 位于1 247 cm^{-1}处的特征吸收峰归属于5-FU分子中C-F键的伸缩振动[25]。上述结果表明5-FU成功负载于MnO_2/GNPs载体表面。

2 MnO_2/GNPs载药–释药及光热性能

为评估MnO_2/GNPs复合材料的载药性能, 首先考察载药时间对药物负载量的影响 (图4A)。在固定药物与载体投料比的条件下, 药物负载量在1 h内达到最高; 延长载药时间至4、6及8 h后, 负载量未见显著提升, 表明药物吸附过程可在1 h内达到平衡。综合考虑载药效率与实验可行性, 最终确定1 h为最优载药时间, 此条件下载药率达64.8%, 证明该载体具有良好的药物吸附能力。

进一步地, 为模拟肿瘤微环境并评估其响应性释药行为, 在不同pH (7.4、6.5、5.0) 的PBS缓冲液及含GSH的PBS溶液中研究了MnO_2/GNPs@5-FU的释药特性, 该载药系统表现出明显的pH/GSH双重响应释放行为 (图4B)。在正常生理pH (7.4) 条件下, 药物释放缓慢且累积释放率较低, 说明材料在生理环境中具有良好稳定性; 而在酸性条件 (pH 5.0) 并存在GSH的介质中, 5-FU释放显著加快, 12 h内累积释放率高达84.9%。该释放行为主要归因于MnO_2在酸性及GSH存在下发生还原性溶解, 导致载体结构解体, 从而实现药物快速释放。以上结果表明, MnO_2/GNPs@5-FU能够特异性响应肿瘤微环境中的酸性与高GSH特征, 实现药物的智能可控释放, 展现出其在靶向化疗领域的应用潜力。

采用808 nm近红外激光系统评估了MnO_2/GNPs复合材料的光热性能。温度–时间曲线显示, 材料的光热升温行为具有明显的浓度与功率密度依赖性 (图4C、D)。在固定激光功率密度 (2.5 W·cm^{-2}) 条件下, 随着材料质量浓度从20增至200 μg·mL^{-1}, 体系在照射5 min后温度可升至64.2 ℃ (图4C)。同样, 在固定浓度 (200 μg·mL^{-1}) 条件下, 体系温度随激光功率密度的增大而显著上升 (图4D)。研究表明, 当环境温度超过42 ℃时可有效诱导肿瘤细胞发生热消融[26]。本实验中, MnO_2/GNPs在激光照射2 min内即可从30 ℃迅速升至52 ℃以上, 表明其具备快速启动肿瘤热疗的能力。此外, 光热效应还可促进肿瘤部位血流灌注, 缓解缺氧微环境, 有助于逆转由缺氧引起的化疗耐药性, 从而增强协同治疗效果。

经过4次激光“开/关”循环实验, 材料的温度变化未出现明显衰减 (图4E), 表明其具有优异的光热稳定性。通过记录一次完整的升降温过程 (图4F), 计算得到该材料的光热转换效率为56.75%, 时间常数为852.74 s, 进一步证实其具备高效的光热转换能力。该性能主要归因于以下机制: 金纳米颗粒的局部表面等离子体共振效应增强了近红外光吸收; MnO_2载体上金纳米颗粒的均匀分散优化了光能利用效率; 材料所具有的球形结构和高比表面积增强了光与物质之间的相互作用。

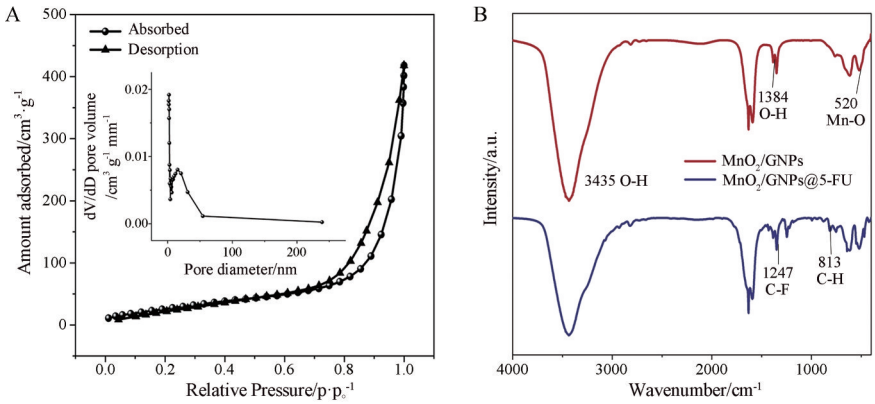


Figure 3 Textural properties of the prepared MnO_2-based materials. A: N_2 adsorption-desorption isotherms (Insert: Pore size distributions of the MnO_2/GNPs materials); B: Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra of the prepared MnO_2/GNPs and MnO_2/GNPs@5-FU materials

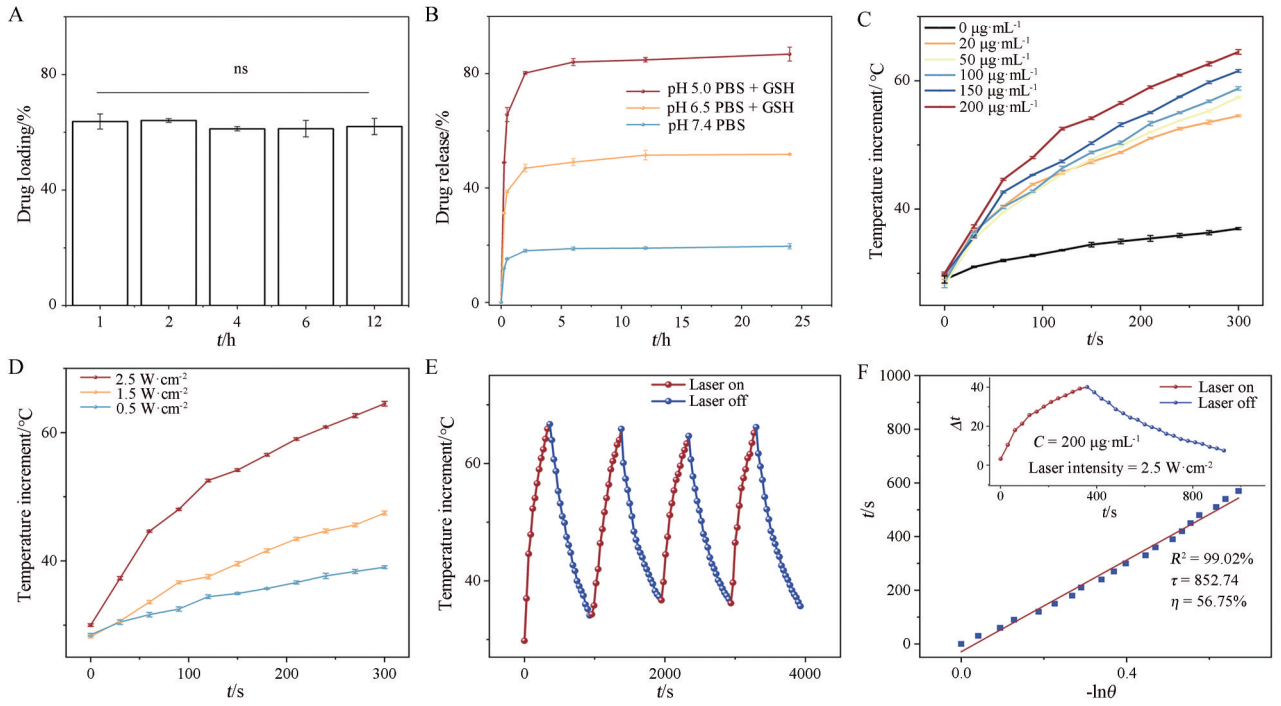


Figure 4 Drug performance and photothermal performance of MnO_2/GNPs material. A: Drug loading of 5-Fu on MnO_2/GNPs surface under different time; B: Drug release of 5-Fu from MnO_2/GNPs surface; C: Photothermal heating curves under NIR laser irradiation (808 nm, 2.5 W·cm^{-2}) at various concentrations; D: Temperature elevation profiles at different laser power densities and after two-month aging at a concentration of 200 μg·mL^{-1}; E: Cyclic heating-cooling curves over four consecutive laser on/off cycles (2.5 W·cm^{-2}, 200 μg·mL^{-1}); F: Calculation of photothermal conversion efficiency derived from the cooling time *versus* negative natural logarithm of temperature driving force. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ns: No significance

本研究将高效光热转换与5-FU化疗相结合, 构建了一种时空可控的协同抗肿瘤新策略。该策略通过近红外激光这一外部刺激, 同时启动两种治疗模式: 一方面, PTT产生的局部高热直接、快速地消融肿瘤, 与5-FU的化疗机制形成互补, 实现多机制协同杀伤, 有望克服肿瘤耐药; 另一方面, 光热效应不仅能改善肿瘤微环境的血流与缺氧状态, 逆转化疗耐药, 更能作为“开关”精准控制5-FU在病灶部位的按需释放, 从而在提升局部疗效的同时, 潜在地降低全身毒性。这种一体化的“热疗−化疗”联动模式, 为开发高效、精准的肿瘤联合治疗方案提供了新的思路与实验支撑。

3 MnO_2/GNPs介导的·OH自由基生成与GSH耗竭

为验证MnO_2/GNPs纳米材料在化学动力学治疗中的催化功能, 首先评估了其在H_2O_2存在下产生·OH的能力。采用亚甲基蓝作为·OH指示剂, 通过其在665 nm处特征吸收峰的衰减程度间接反映·OH的生成情况。如图5A所示, 当体系中同时存在MnO_2/GNPs与H_2O_2时, MB在665 nm处的吸收强度显著下降, 表明·OH被有效催化生成。该结果表明MnO_2/GNPs在模拟肿瘤微环境下可介导类Fenton反应, 高效产生具有细胞毒性的·OH, 展现出其在化学动力学治疗中的应用潜力。

然而, 肿瘤细胞内高浓度的谷胱甘肽能够清除生成的·OH, 严重削弱化学动力学治疗效果[27]。因此, 构建可同步消耗GSH的纳米体系对增强治疗效果至关重要。其次评估了MnO_2/GNPs对GSH的调控能力, 采用Ellman试剂法对其消耗GSH的性能进行定量分析。DTNB可与GSH发生特异性反应, 生成在412 nm处具有特征吸收的黄色产物TNB^{2-}。如图5B所示, 随着MnO_2/GNPs与GSH共孵育时间的延长, 412 nm处吸光度呈时间依赖性下降, 表明GSH被材料有效清除。该结果证明MnO_2/GNPs纳米系统能够高效降低细胞内GSH水平, 破坏肿瘤细胞的抗氧化防御体系, 从而为增强化学动力学治疗效能提供关键支持。

4 细胞毒性试验

良好的生物相容性是纳米材料应用于活体治疗的重要前提。首先, 评估了材料对正常人类脐静脉内皮细胞 (Huvec) 的毒性。如图6A和B所示, 在与不同浓度 (5～150 μg·mL^{-1}) 的MnO_2/GNPs及其载药复合物(MnO_2/GNPs@5-FU) 分别共孵育24 h后, Huvec细胞存活率始终维持在85%与75%以上。这表明两种材料均具备良好的生物安全性, 为后续活体实验奠定了基础。

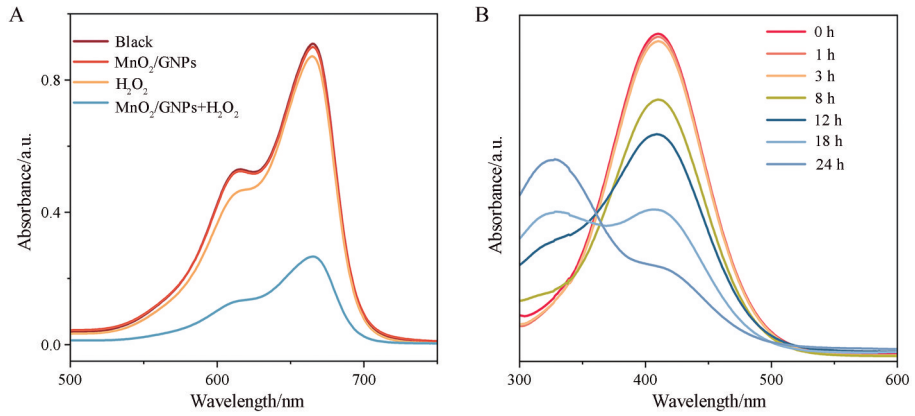


Figure 5 Evaluation of MnO_2/GNPs nanocomposites for enhancing chemodynamic therapy. A: ·OH generation catalyzed by MnO_2/GNPs in the presence of H_2O_2, detected using methylene blue (MB) as an oxidative probe; B: Depletion of glutathione (GSH) after incubation with MnO_2/GNPs, measured *via* the 5,5′-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) assay

其次, 在确认生物安全性的基础上, 进一步在模拟TME中采用CCK-8法系统评估了该纳米平台对4T1肿瘤细胞的杀伤效应 (图6C), 以验证其协同治疗潜力。研究结果显示, 空白载体MnO_2/GNPs表现出优异的生物相容性, 细胞存活率始终高于80%。游离5-FU展现出典型的浓度依赖性细胞毒性。相比之下, 载药复合物MnO_2/GNPs@5-FU在无外源H_2O_2条件下的即时杀伤效果弱于同浓度的游离5-FU, 这与其药物缓释特性相符。由于在24 h的实验周期内, 5-FU未能从载体中完全释放, 导致杀伤效果相对温和, 间接证明了该纳米载体的可控释放性能。

为了验证CDT与化疗的协同效应, 设立了关键对照组。结果显示, 单独的H_2O_2未显著改变5-FU的细胞毒性 ("5-FU + H_2O_2"组与"5-FU"组无显著差异), 排除了H_2O_2对药物敏感性的干扰。在"MnO_2/GNPs + H_2O_2"组 (CDT治疗) 中, 随着浓度升高, 细胞存活率显著下降, 最高浓度时为37.5%。该效应主要源于材料中释放的Mn^{2+}通过类芬顿反应催化H_2O_2生成高毒性的·OH, 有效诱导细胞凋亡。联合治疗组"MnO_2/GNPs@5-FU + H_2O_2"展现出最强的肿瘤杀伤能力, 最高浓度下细胞存活率降至11.6%。

为深入探究材料的细胞毒性机制, 采用Calcein AM/PI双重染色法, 结合ImageJ软件对处理12 h后的细胞凋亡情况进行了半定量分析。结果如图6D、E所示, 与对照组相比, 即使在较高浓度 (150 μg·mL^{-1}) MnO_2/GNPs处理条件下, 早期凋亡和晚期凋亡细胞的总比例并无显著增加。细胞死亡主要表现为直接的坏死 (PI阳性), 而凋亡通路未见明显激活。该结果表明, MnO_2/GNPs复合材料在实验浓度范围内不会诱导显著的程序性细胞死亡。这一发现与之前获得的细胞存活率数据相一致, 进一步从细胞死亡机制层面支持了材料的生物安全性。

此外, 通过测定不同浓度下MnO_2/GNPs复合材料的溶血率 (图6F), 即使在高浓度 (500 μg·mL^{-1}) 条件下, 材料引起的溶血率仍低于国际认可的5%安全阈值。这表明该复合材料在与血液成分接触时, 不会显著引发红细胞破裂, 具备良好的血液相容性。综上所述, 结合24 h细胞存活率、溶血率及细胞凋亡率的实验数据, MnO_2/GNPs复合材料在测试浓度范围内显示出优异的生物相容性和血液相容性, 不会引发显著的溶血反应或细胞凋亡, 为其作为安全药物递送平台提供了有力的实验依据。

5 细胞内ATP和GSH检测

在评估纳米材料对肿瘤细胞的干预效果时, 检测细胞内ATP与GSH水平具有重要参考价值。ATP作为细胞能量代谢的核心指标, 其水平变化可直观反映细胞代谢活性状态; 而GSH作为细胞内关键的抗氧化分子, 在维持氧化还原稳态中发挥核心作用, 其含量直接关系到细胞清除自由基及抵抗氧化应激的能力。通过同步测定这两种分子, 可从能量代谢与氧化防御双重视角评估纳米材料对肿瘤细胞的调控作用, 为揭示其抗肿瘤机制提供关键依据。如图7A所示, 经MnO_2/GNPs处理的细胞内GSH浓度随时间推移逐渐降低, 表明该材料可有效消耗细胞内GSH, 削弱其抗氧化防御能力。这一过程可能进一步增强由氧化应激介导的细胞毒性效应, 提示该材料在促进肿瘤细胞凋亡中具有潜在作用。

不同处理条件下4T1细胞内ATP水平的变化如图7B所示, 与对照组相比, 单独使用H_2O_2、MnO_2/GNPs、5-FU、5-FU与H_2O_2联合处理及未加H_2O_2的MnO_2/GNPs@5-FU组, 均未引起ATP水平的显著改变。然而, 在H_2O_2存在条件下, MnO_2/GNPs可显著降低细胞内

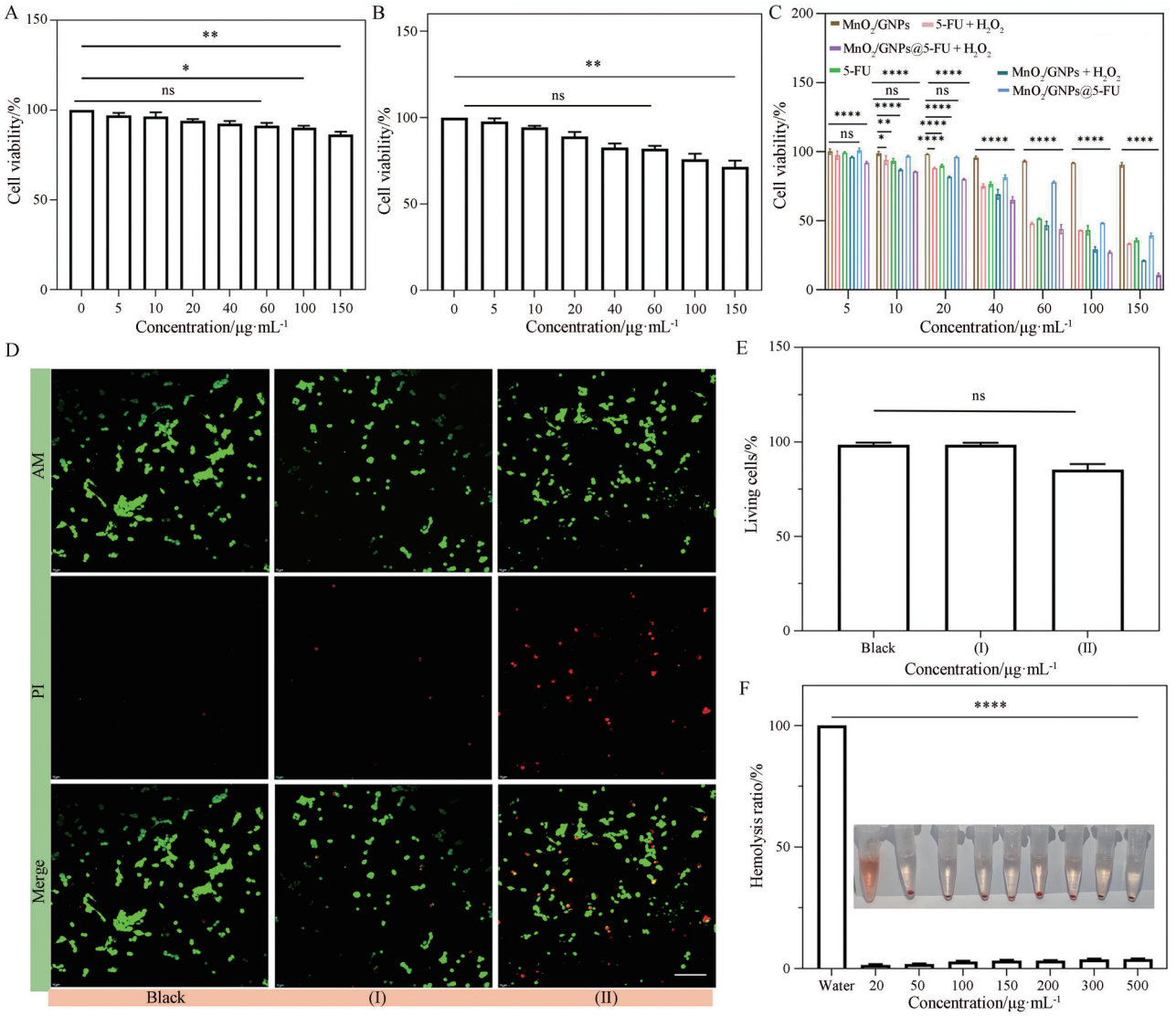


Figure 6 Tumor-specific cytotoxicity of MnO_2/GNPs and percentage of living cells corresponding to panel. A: Survival rate of Huvec cells treated with MnO_2/GNPs; B: Survival rate of Huvec cells treated with MnO_2/GNPs@5-FU; C: Survival rate of 4T1 cells treated with MnO_2/GNPs, H_2O_2 + 5-FU, H_2O_2 + MnO_2/GNPs@5-FU, H_2O_2 + MnO_2/GNPs, MnO_2/GNPs@5-FU and 5-FU; D: AM/PI differential staining of 4T1 cells after diverse administrations (scale bar = 100 μm); E: Percentage of living cells corresponding to panel; F: Hemolysis rates of red blood cells after incubation with water (positive control) and various concentrations of MnO_2/GNPs (inset: Corresponding digital photographs of sample-laden centrifugate tubes). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.000\ 1$

ATP 含量, 而 MnO_2/GNPs@5-FU 载药体系在相同条件下对 ATP 的抑制作用更为明显。上述结果表明, 该纳米材料在模拟肿瘤微环境中能够通过催化产生 ROS, 有效干扰肿瘤细胞的能量代谢过程, 从而抑制其代谢活性。

讨论

本研究通过将球形 MnO_2 与 GNPs 相结合, 成功构建了一种具有多重响应性的化疗药物智能递送系统。实验结果表明, 所制备的球形 MnO_2/GNPs 载药纳米载体具备优异的光热转换效率、较高的药物负载能力、对 GSH 及酸性 pH 敏感的释药特性。以 5-FU 作为模型药物时, 该系统表现出显著的载药性能; 体外释放动力学结果进一步表明, 在模拟肿瘤微环境的高浓度 GSH 和酸性条件下, 药物能够持续释放。体外细胞实验表明, 该体系通过结合 MnO_2 介导的 CDT 与 5-FU 化疗, 对 4T1 肿瘤细胞实现了高效的协同杀伤效果。本研究充分证明了球形 MnO_2/GNPs 作为一种新型多重刺激响应型纳米药物载体的应用潜力, 为开发智能纳米药物递送平台提供了初步的体外实验依据与新思路。

尽管本文构建的 MnO_2/GNPs@5-FU 纳米系统在体外展现出良好的药物控释性能与协同治疗效果, 但仍存在一定局限性。例如, 本文主要聚焦于体外细胞

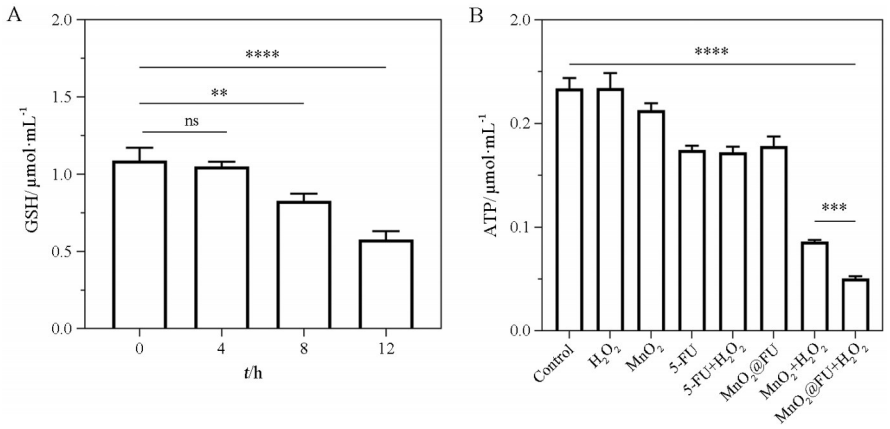


Figure 7 Effects of various treatments on intracellular glutathione (GSH) and adenosine triphosphate (ATP) levels in 4T1 cells. A: Intracellular GSH levels after incubation with MnO_2/GNPs at different time points; B: The ATP level of 4T1 cells treated with MnO_2/GNPs, H_2O_2 + 5-FU, H_2O_2 + MnO_2/GNPs@5-FU, H_2O_2 + MnO_2/GNPs, MnO_2/GNPs@5-FU and 5-FU. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$

层面的验证, 尚未开展动物体内药效及生物分布研究, 因此其在实际肿瘤组织中的靶向积累效率与体内安全性仍需进一步评估。未来工作中, 将致力于优化该纳米系统的表面功能化修饰, 以进一步提高其对肿瘤组织的主动靶向能力; 同时, 拟通过构建肿瘤小鼠模型, 系统评估其体内抑瘤效果、生物分布及代谢行为, 为其临床转化提供更为充分的实验依据。

作者贡献: 王玖阳负责研究设计、数据采集、处理和分析、撰写论文初稿; 王德升负责数据采集、处理和分析; 成日青负责论文撰写和修订; 郭慧卿负责提供实验设备; 塔娜负责提供实验试剂; 齐和日玛负责研究规划、设计、实施、资金支持、论文修改; 徐长进负责研究规划、设计、实施、资金支持、论文修改。

利益冲突: 所有本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Zhou WX, Jia YJ, Liu YN, et al. Tumor microenvironment-based stimuli-responsive nanoparticles for controlled release of drugs in cancer therapy [J]. Pharmaceutics, 2022, 14: 2346.

[2] Li Y, He C, Shen AN, et al. pH of microenvironment directly modulates the phenotype and function of cancer-associated fibroblasts [J]. ACS Omega, 2025, 10: 3937-3943.

[3] Chu Z, Yang J, Zheng W, et al. Recent advances on modulation of H_2O_2 in tumor microenvironment for enhanced cancer therapeutic efficacy [J]. Coord Chem Rev, 2023, 481: 215049.

[4] Jafari R, Rahbarghazi R, Ahmadi M, et al. Hypoxic exosomes orchestrate tumorigenesis: Molecular mechanisms and therapeutic implications [J]. J Transl Med, 2020, 18: 474.

[5] Park Y, Jeong EM. Glutathione dynamics in the tumor microenvironment: A potential target of cancer stem cells and T cells [J]. Int J Stem Cells, 2024, 17: 270-283.

[6] Zhao HY, Ao LM, Sorina, et al. Ferroptosis and gastric cancer: From molecular mechanisms to clinical implications [J]. Front Immunol, 2025, 16: 1581928.

[7] Sun RL, Liu RT, Tian YZ, et al. Removing barriers to tumor 'Oxygenation': Depleting glutathione nanozymes in cancer therapy [J]. Int J Nanomedicine, 2025, 20: 5613-5643.

[8] Peng PL, Cao JJ, Cheng WT, et al. Manganese dioxide-based *in situ* vaccine boosts antitumor immunity *via* simultaneous activation of immunogeniccell death and the STING pathway [J]. Acta Biomater, 2025, 194: 467-482.

[9] Yang GB, Xu LG, Chao Y, et al. Hollow MnO_2 as a tumor-microenvironment-responsive biodegradable nano-platform for combination therapy favoring antitumor immune responses [J]. Nat Commun, 2017, 8: 902.

[10] Chen JY, Bu CX, Lu YT, et al. Bioresponsive nanoreactor initiates cascade reactions for tumor vasculare ormalization and lactate depletion to augment immunotherapy [J]. Biomaterials, 2025, 317: 123100.

[11] Liang LJ, Jia M, Zhao M, et al. Progress of nanomaterials based on manganese dioxide in the field of tumor diagnosis and therapy [J]. Int J Nanomedicine, 2024, 19: 8883-8900.

[12] Xie WJ, Hao QJ, Ye Z, et al. Spherical nucleic acids-directed cryosynthesis of manganese nanoagents for tumor imaging and therapy [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2025, 64: e202503004.

[13] Jiang SQ, Li XH, Zhang F, et al. Manganese dioxide - based nanocarrier delivers paclitaxel to enhance chemotherapy against orthotopic glioma through hypoxia relief [J]. Small Methods, 2022, 6: e2101531.

[14] Zhao JR, Cai JM, Hu JY, et al. Biodegradable hollow MnO_2 decorated by carbon dots with cholesterol depletion capability for cascaded amplification of sono-immunotherapy [J]. Biomaterials, 2026, 325: 123559.

[15] Zhang YF, Feng GL, He T, et al. Traceable lactate-fueled self-acting photodynamic therapy against triple-negative breast cancer [J]. Research, 2024, 7: 0277.

[16] Azhagapillai P, Reddy KSK, Guerrero Pena GDJ, et al. Synthesis of mesoporous carbon adsorbents using biowaste crude glycerol as a carbon source *via* a hard template method for efficient CO_2 capture [J]. ACS Omega, 2023, 8: 21664-21676.

[17] Zhao DC, Yang NL, Xu LK, et al. Hollow structures as drug carriers: Recognition, response, and release [J]. Nano Res, 2022, 15: 739-757.

[18] Broadbent M, Chadwick SJ, Brust M, et al. Gold nanoparticles for photothermal and photodynamic therapy [J]. ACS Omega, 2024, 9: 44846-44859.

[19] de Francesco T, Richtsmeier D, Lee S, et al. Synthesis and characterization of gold nanoparticle loaded block copolymer vectors for biomedical applications: A multivariate analysis [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2025, 17: 500-512.

[20] Hainfeld JF, O′Connor MJ, Lin P, et al. Infrared-transparent gold nanoparticles converted by tumors to infrared absorbers cure tumors in mice by photothermal therapy [J]. PLoS One, 2014, 9: e88414.

[21] Lo CY, Tsai SW, Niu H, et al. Gold-nanoparticles-enhanced production of reactive oxygen species in cells at spread-out bragg peak under proton beam radiation [J]. ACS Omega, 2023, 8: 17922-17931.

[22] Suh DH, Lee SJ, Kim H, et al. Effect of CO_2 fractional laser pretreatment in photothermal therapy using ethosome gold nanoparticles: A preliminary study [J]. J Cosmet Dermatol, 2025, 24: e70349.

[23] Shu JY, Chen C, Yang CY, et al. Biodegradation-assisted removal of sulfur-based odor compounds in rural drinking water using durable chitosan/polyvinyl alcohol biochar aerogels [J]. Bioresour Technol, 2025, 418: 131915.

[24] Otálora González CM, Felix M, Bengoechea C, et al. Development and characterization of edible films based on cassava starch modified by corona treatment [J]. Foods, 2024, 13: 468.

[25] Sang YN, Miao PP, Chen T, et al. Fabrication and evaluation of graphene oxide/hydroxypropyl cellulose/chitosan hybrid aerogel for 5-fluorouracil release [J]. Gels, 2022, 8: 649.

[26] Liang ZX, Li XF, Chen XF, et al. Fe/MOF based platform for NIR laser induced efficient PDT/PTT of cancer [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1156079.

[27] Zhang Y, Wang FM, Shi L, et al. Nanoscale coordination polymers enabling antioxidants inhibition for enhanced chemodynamic therapy [J]. J Control Release, 2023, 354: 196-206.