

生物可降解胶束为载体的双光子光动力疗法抗小鼠乳腺癌实验研究

罗 雷*, 刘江波, 尹 珍, 周旭阳, 徐凡舒, 罗永煌

(西南大学药学院, 重庆 400716)

摘要: 光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 是利用光和光敏剂高效治疗肿瘤的方法。但多数光敏剂在体内分布的选择性差、难溶于水以及仅能被穿透力较弱的光线激发而限制了疗效。本文利用生物可降解胶束甲氧基聚乙二醇-*b*-聚 *D,L*-丙交酯 [methoxy poly(ethylene glycol)-polylactide copolymer, mPEG-PDLLA] 作为药物载体, 增加光敏剂的溶解度, 便于静脉注射, 并通过尺寸效应提高药物在肿瘤部位的分布, 同时在此载体中包埋新型强双光子吸收化合物 (two-photon absorption compound, L_{TPA}), 作为近红外激光的转换器以间接激发光敏剂焦脱镁叶绿酸 a (pyropheophorbide a, PPa), 旨在增强对生物组织的穿透力, 高效杀死肿瘤细胞, 实现双光子光动力疗法。结果表明, 激光粒度仪测得该胶束的粒径约为 55 nm, 在电镜下呈形态规则的球形, 粒径均一, 包埋的双光子化合物和光敏剂可在酸性或中性 pH 值下从胶束中同步释放, 且在 808 nm 近红外激光照射后, 检测到单线态氧生成; 在细胞实验中, 4T1 小鼠乳腺癌细胞在双光子光动力疗法 (TP-PDT) 的作用下, 存活率受到明显抑制, 且通过 Annexin-V/FITC 标记后发现大量细胞被诱导凋亡/坏死; 载药胶束在小鼠肿瘤模型上 (动物实验符合中国实验动物护理和使用准则, 并经西南大学药学院实验动物伦理委员会批准) 具有一定的靶向蓄积作用, TP-PDT 对肿瘤生长具有较明显的抑制效果。综上, 基于胶束为载体的 TP-PDT 是改进现有光动力疗法弊端的新尝试, 在抗肿瘤的应用上具有良好的探索前景。

关键词: 胶束; 单线态氧; 双光子吸收; 光动力疗法; 乳腺癌

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)05-0927-10

Biodegradable micelles for two-photon photodynamic therapy in a mouse model of breast cancer

LUO Lei*, LIU Jiang-bo, YIN Zhen, ZHOU Xu-yang, XU Fan-shu, LUO Yong-huang

(College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) is one of the new approaches for cancer treatment with high efficacy. However, applications of current photosensitizers are restricted to skin and superficial tumor due to poor *in vivo* targeting ability, poor water solubility and short wavelength excitement, which limits penetration therefore therapeutic depth. Here, a biodegradable polymeric micelle, methoxy poly(ethylene glycol)-polylactide copolymer (mPEG-PDLLA), is employed as drug delivery system to co-encapsulate strong two-photon absorption compound (L_{TPA}) and photosensitizers. This delivery system is designed to target tumor passively, resulting in near infrared light with an approximately 808 nm wavelength becoming able to indirectly excite photosensitizers through fluorescence resonance energy transfer. Tumor cells and microvessels could be damaged by the generated singlet oxygen. The average size of drug loaded micelles was approximately 55 nm and showed a spherical shape. Both compounds could be released simultaneously from micelles under either weak acid and neutral pH conditions. Reactive oxygen species was produced intracellularly during two-photon PDT process and induced cell apoptosis/necrosis,

收稿日期: 2019-01-10; 修回日期: 2019-02-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503009).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-23-68251225, E-mail: drluolei@swu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0037

which was quantified by Annexin-V/FITC assays. Time-dependent *ex vivo* organ distribution and *in vivo* anticancer efficacy results suggested that the drug carriers could accumulate in tumors and suppress tumor growth by two-photon PDT. All animals experiments were performed in line with national regulations and approved by the Animal Experiments Ethical Committee of College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University. In summary, we have employed two-photon PDT for breast cancer treatment successfully in a mouse model and have demonstrated the significance of delivery system in such therapeutics.

Key words: micelle; singlet oxygen; two-photon absorption; photodynamic therapy; breast cancer

肿瘤是严重威胁人类健康的重大疾病之一,也是现代医学所面临的难题。光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 是一种利用光、光敏剂 (photosensitizer, Ps) 和氧分子发挥光动力效应的局部微创疗法^[1,2]。光动力疗法的策略是通过特定波长的激光激发肿瘤部位的光敏剂,在体内通过一系列光反应产生具有很强反应活性的单线态氧 (singlet oxygen, $^1\text{O}_2$),进而与肿瘤细胞内的生物大分子发生氧化反应,杀死肿瘤细胞,封闭肿瘤微血管,使其凋亡、缺血坏死,且不易产生化疗药物的耐药效应,达到无痛无痕的治疗^[3-5]。PDT在乳腺癌治疗的相关研究中主要用于手术后的辅助及显影诊断,针对胸腔内壁的肿瘤转移结节及片状浸润^[3-5]。但 PDT在癌症治疗中也存在局限性。首先,光敏剂受自身理化性质影响,大多只能被紫外或可见光所激发,此波段的光源在作用时受血液和组织的吸收、散射影响,限制了 PDT的治疗深度,使其临床应用大多在皮肤或者浅表肿瘤^[6-8]。其次,光敏剂如卟啉类、钆菁类和吩噻嗪类等,大多难溶于水,容易在体内形成聚集体,影响单线态氧的产生^[7-9];最后,光敏剂在体内分布的选择性较差,通过血液循环蓄积至肿瘤浓度不足,影响治疗效果的同时对健康组织造成光毒性^[10]。因此,研究可靶向递送光敏剂的递药系统且利用近红外光作为激发光源的光动力疗法,是亟待解决的科学问题。

利用近红外光激发光敏剂,可延伸 PDT的治疗深度,通常有直接激发和间接激发两种策略。近红外光可直接激发的光敏剂非常少,基于 PDT作用机制“光敏剂的三线态能级需要高于氧分子的单线态能级”,增大了这类光敏剂的合成难度^[11]。另一种间接激发的策略,是利用非线性光学的原理将近红外光上转换为可激发光敏剂的可见光,其中,由有机小分子或其配合物构成的新型强双光子吸收材料具有良好的应用前景。双光子吸收 (two-photon absorption, TPA) 通常指材料分子在强脉冲激光激发下发生极化,通过虚拟中间态同时吸收两个光子达到高能态的过程。该过程能够同时吸收两个低能量光子,从基态跃迁到近两倍入射光子能量的激发态,实现长波长激发,短波长发射^[12-16]。

利用药剂学与材料学知识的交叉结合,构建药物递送系统是解决难溶性药物水溶性和增加在肿瘤组织蓄积的最好选择之一^[17]。同时,由于双光子光动力疗法 (two-photon PDT, TP-PDT) 需要通过荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 间接激发光敏剂,在药物递送系统的帮助下,供体 (TPA材料) 与受体 (光敏剂) 之间的距离可小于 10 nm,有利于能量转移的发生^[18-20]。单甲氧基聚乙二醇-聚丙交酯 [methoxy poly(ethylene glycol)-polylactide copolymer, mPEG-PDLLA] 是一种生物相容性良好的可降解聚合物,可在水溶液中自组装形成胶束,用作难溶性药物、蛋白和多肽等的载体^[19-21]。

在前期研究中,作者合成了在近红外波段有较大的 TPA截面 (大于 1 000 GM, 1 GM = 10^{-50} cm⁴s/photon) 的双光子化合物 (L_{TPA})。本实验选用的焦脱镁叶绿素 a (pyropheophorbide a, PPa) 是叶绿素 a 的降解产物之一,PPa 及其衍生物被广泛应用于光动力疗法。选用 PPa 作为光敏剂模型药物,是由于其在 340~460 nm 均有较强吸收。且 L_{TPA} 和 PPa 都具有较强的疏水性能,有利于包载于胶束的疏水内核。此外,作者合成了聚甲基丙烯酸酯为骨架的 pH 值响应聚合物包载了新型三苯胺氰基乙酸配合物 L_{TPA} ^[22] 和 PPa,在生理 pH 值条件下此胶束内核的疏水性较弱 (或对水分子通透性较强),使得光敏剂分子发生聚集,影响 $^1\text{O}_2$ 产率;当处于弱酸性 pH 值时,聚合物的两个嵌段均离子化,正负电荷相互吸引形成疏水性较强聚集体,此时 PDT 被激活^[23]。此过程利用 pH 值改变开/关了 TP-PDT 效应,减少了治疗过程中的光毒性。但 pH 值开/关的过程及光敏剂分子的聚集,使得 PDT 效率降低,所以选择一种生物相容性好、疏水内核能使光敏剂保持分子状态的药物传递系统有望解决上述问题。

本文利用生物可降解胶束 mPEG-PDLLA 同时装载 L_{TPA} 和光敏剂 PPa (图 1),使用 TP-PDT 对抗小鼠乳腺癌。对药物递送系统的形貌、体外释放、单线态氧产率等进行表征;考察胶束对 4T1 小鼠乳腺癌细胞的光、暗毒性,并利用双光子激光共聚焦显微镜观察细胞摄

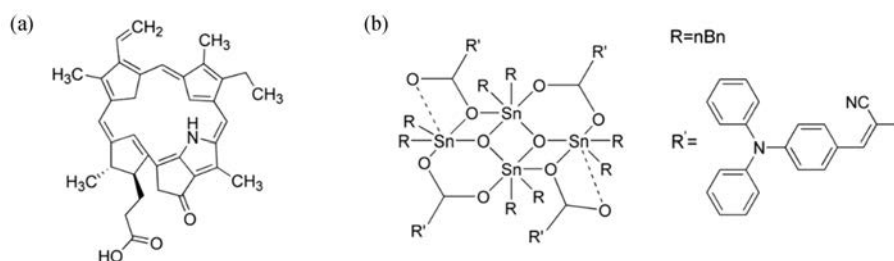


Figure 1 Molecular structures of photosensitizer, pyropheophorbide a (PPa) (a) and two-photon absorption compound (L_{TPA}) (b)

取、胞内活性氧变化和光动力效应对细胞形态的影响; 利用小鼠皮下肿瘤模型评价给药系统的靶向性和有效性等。

材料与方法

药品与试剂 PPa ($M_n = 534.44$, 上海先辉医药科技有限公司); mPEG₂₀₀₀-PDLLA₂₀₀₀ (济南岱罡生物工程有限公司); 蒽-9,10-二丙酸二钠盐 (anthracene-9,10-dipropionic acid disodium salt, ADPA, 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 胰蛋白酶-EDTA、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物 (MTT)、4,6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐 (DAPI)、syto 9,2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) (美国 Sigma-Aldrich 公司); Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM, 南京凯基生物科技发展有限公司); 胎牛血清 (FBS, 四季青生物有限公司); 再生纤维素透析膜 (Spectra/Por 6, 截留分子量: 3 500 Da, 美国 Fisher 公司)。

主要仪器 JEM-1200EX 透射电子显微镜 (日本电子公司); 激光粒度分析仪 (Zetasizer, 英国马尔文仪器公司); UV-6100 型分光光度计 (上海马达仪器有限公司); F-7000 荧光分光光度计 (日本岛津公司); 双光子激光共聚焦显微镜 (ZEISS 710, 德国 Carl Zeiss 公司); FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 Becton-Dickinson 公司); 小动物活体成像系统 (Fx Pro, 德国 Bruker 公司); 660 nm 和 808 nm 光线耦合半导体固态激光器 (中川光电有限公司)。

细胞培养 4T1 细胞购自南京凯基生物科技发展有限公司。将小鼠乳腺癌细胞 (4T1) 在含 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 抗生素 (链霉素、青霉素) 的高糖 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 中, 37 °C、5% CO₂ 下培养。

实验动物 选择雌性 BALB/c 小鼠 (20 ± 2 g, 6~8 周龄) 用于皮下接种肿瘤, 动物许可证号: SYXK (YU) 2014-0002。小鼠购自重庆医科大学实验动物中心, 并饲养于温度恒定, 光照和黑暗交替循环的房间。动物实验符合中国实验动物护理和使用准则, 并经西南大学药学院实验动物伦理委员会批准。

胶束制备 采用薄膜水化法分别制备 4 种胶束: 空白胶束 (blank micelles, BM_{2K})、载 PPa 胶束 (PPa encapsulated micelles, PM_{2K})、载 L_{TPA} 胶束 (L_{TPA} encapsulated micelles, L_{TPA} M_{2K}) 和载 PPa/ L_{TPA} 胶束 (PPa and L_{TPA} co-encapsulated micelles, PL_{TPA}M_{2K})。PL_{TPA}M_{2K} 具体制备过程如下: 将 mPEG₂₀₀₀-PDLLA₂₀₀₀ 10 mg 溶于 2 mL 氯仿中, 与溶解了药物 (1 mg PPa 和 L_{TPA} , 1:1 w/w) 的 2 mL 氯仿溶液混合, 在 40 °C 下减压旋转蒸发至少 30 min, 形成薄膜。随后加入 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 1 mL, 在室温下磁力搅拌 6~8 h, 将溶液通过 0.22 μm 膜过滤器过滤以除去未加载的疏水性药物。胶束溶液储存在 4 °C 冰箱备用。如上所述类似地制备 BM_{2K}、PM_{2K} 和 L_{TPA} M_{2K}。

包封率 (encapsulation efficiency, EE) 和载药量 (loading capacity, DL) 的测定: 取 1 mL 胶束溶液, 冻干后用等体积 DMSO 复溶, UV-Vis 分光光度计检测吸光度值, 根据实验室制备的标准曲线计算胶束中 PPa 和 L_{TPA} 的浓度。EE 和 DL 按下式计算:

$$EE (\%) = \frac{W_L}{W_0}$$

$$DL (\%) = \frac{W_L}{W_0 + W_M}$$

其中, W_L 为胶束中药物质量, W_0 为药物总质量, W_M 为聚合物质量。

胶束的表征 用 JEM-1200EX 透射电子显微镜表征胶束的形态。用 Zetasizer 测量胶束的平均粒径和 ζ 电位 (聚合物质量浓度约为 1 mg·mL⁻¹), 平行测样 3 次。用 UV-6100 型分光光度计和 F-7000 荧光分光光度计记录载药胶束的紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱。

体外释放考察 采用透析法^[24]考察载药胶束中 L_{TPA} 和 PPa 的体外释放度。将 pH 5.4 和 7.4 含 0.1% Tween-80 的 0.01 mol·L⁻¹ PBS 溶液作为两种释放介质, 两种介质均可使 PPa 和 L_{TPA} 释放达到漏槽条件。操作过程如下: 将 5 mL PL_{TPA}M_{2K} 溶液 (CL_{TPA} 和 C_{PPa} 分别为 5.0 和 1.1 mg·mL⁻¹) 置于透析袋 (MWCO = 3 500 Da) 内, 然

后置于 100 mL 释放介质中, 在 37 °C 下搅拌, 于 0、4、8、12、16、20 和 24 h 取袋外液体 1 mL 并补充 PBS 缓冲液 1 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤所取液体, 冻干后用 DMSO 复溶, UV-Vis 检测吸光度值。根据标准曲线计算 PPa 和 L_{TPA} 的累积释放率。

单线态氧的测定 ADPA 在 400 nm 处吸光度值因 ¹O₂ 的漂白而降低, 用来测定 ¹O₂ 的产率。将 DMSO 中的载药胶束或游离 PPa 与 20 μmol·L⁻¹ ADPA 在 PBS 溶液 (pH 7.4) 中混合。然后将混合溶液装在 1 cm×1 mm、可容纳 0.5 cm³ 溶液的石英微槽中, 用特定波长的激光 (单光子激发波长 660 nm, 双光子激发波长 808 nm) 照射。检测不同光照时间 ADPA 吸光度值的变化, 以评估样品 ¹O₂ 产率。

TPA 横截面测定 以含钛蓝宝石激光器 (680~1 080 nm, 80 MHz, 140 fs) 作为光源, 采用双光子激发荧光法获得样品的双光子吸收截面 (δ)。L_{TPA}M_{2K} 溶液的浓度为 1.0×10⁻⁴ mol·L⁻¹。因此, 样品的 δ 值由以下公式计算:

$$\delta_s = \delta_r \cdot F_s \cdot \Phi_r \cdot C_r \cdot n_r / F_r \cdot \Phi_s \cdot C_s \cdot n_s$$

其中, 下标 r 代表对照品, s 是待测样品, C 是溶液的浓度, n 是溶液的折射率, F 是检测到的双光子诱导荧光信号的积分面积, Φ 是荧光量子产率。δ 参考值取自文献^[25]。

细胞摄取成像 配有含钛蓝宝石激光器的双光子激光共聚焦显微镜 ZEISS 710 被用于细胞摄取成像实验。在细胞摄取测定中, 4T1 细胞以 5×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板内, 细胞培养过夜贴壁, 分别与 PM_{2K} (5.1 μmol·L⁻¹ PPa)、L_{TPA}M_{2K} (1.3 μmol·L⁻¹ L_{TPA}) 和 PL_{TPA}M_{2K} (5.1 μmol·L⁻¹ PPa 和 1.3 μmol·L⁻¹ L_{TPA}) 孵育 2 h, 再与染料 DAPI 和 Syto9 在 37 °C (5% CO₂) 下孵育 3 h。在培养板中加入 PL_{TPA}M_{2K} 后监测细胞活性摄取 30 min。所有图像数据通过 LSM Image Browser 和 Image J 分析。

活性氧测定 用活性氧检测试剂盒测定 4T1 细胞内活性氧水平的变化。DCFH-DA 在活细胞中被活性氧氧化为 2',7'-二氯荧光素 (2',7'-dichlorofluorescein, DCF), 其在 530 nm 处具有荧光信号。将细胞与 PL_{TPA}M_{2K} 孵育 12 h, 然后在 37 °C 下与 DCFH-DA 染料 (10 μm) 避光孵育 30 min。用 PBS 洗涤 3 次后, 在显微镜下观察细胞内绿色荧光 (E_x = 485 nm, E_m = 535 nm) 在 808 nm 激光光照前后的变化。

体外细胞毒性实验 体外细胞毒性实验分为有、无光照 (光、暗毒性) 两个部分。4T1 细胞以 1×10⁵ 个/孔接种于 96 孔板内, 细胞在孵育过夜后给药。对于无光照细胞毒性测定, 将各样品按浓度梯度 (n = 6) 分别加

入 96 孔板, 与细胞避光孵育 48 h 后除去上清液, 将含有 MTT (5 mg·mL⁻¹) 的 100 μL 新培养液加入到每个孔中, 孵育 4 h 后, 除去上清液, 加入 150 μL DMSO 以溶解甲脎结晶。用酶标仪在 570 nm 处测量吸光度值。通过 MTT 分析确定活细胞的数量, 与对照进行比较以确定相对存活力。对于激光介导的细胞毒性测定, 将 PL_{TPA}M_{2K} (0.3 μmol·L⁻¹ PPa 和 0.1 μmol·L⁻¹ L_{TPA}) 与细胞孵育 6 h 后, 以 0.3 W·cm⁻² 功率强度、808 nm 激光在设定时间内照射, 然后进行相同的 MTT 实验, 以测定细胞存活率。

膜联蛋白 V/PI 细胞凋亡检测分析 利用流式细胞仪, 用膜联蛋白 V-FITC 和 PI (Annexin V-FITC/PI) 试剂盒评估由 PL_{TPA}M_{2K} 诱导的凋亡细胞群。将 4T1 细胞接种在 6 孔板 (3×10⁶ 个细胞/孔) 中过夜贴壁。PL_{TPA}M_{2K} + 激光组: PL_{TPA}M_{2K} (0.55 μmol·L⁻¹ PPa 和 0.15 μmol·L⁻¹ L_{TPA}) 与细胞一起孵育 6 h, 然后用 808 nm 激光 (0.3 W·cm⁻²) 照射 10 min。PL_{TPA}M_{2K} (0.55 μmol·L⁻¹ PPa 和 0.15 μmol·L⁻¹ L_{TPA}) 组和空白组以类似方法但不进行激光照射, 然后将膜联蛋白 V-FITC 和 PI 加入细胞悬液, 使用 FACS Calibur 流式细胞仪进行分析。

离体器官荧光成像 雌性 BALB/c 小鼠, 体重 18~22 g, 皮下接种处于对数生长期的 4T1 细胞, 每只小鼠接种的细胞数为 5×10⁵ 个。使用 PPa (E_x = 640 nm, E_m = 710 nm) 作为荧光探针, 测定胶束在模型小鼠体内的分布。将载药胶束经尾静脉注射于小鼠中 (n = 3)。在给药后 0.5、2、4 和 12 h, 分别处死小鼠。取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和肿瘤, 通过小动物活体成像系统进行观察。

载药胶束药效学考察 载药胶束的抗癌活性在小鼠 4T1 皮下肿瘤模型上评估。将 5×10⁵ 个 4T1 细胞注射至皮下造模。将 50~100 mm³ 肿瘤体积的荷瘤 BALB/c 小鼠随机分成 7 组, 具体分组见表 1。每组 6 只小鼠。在第 1、4、7 天分别进行尾静脉注射给药及光照, L_{TPA} 和

Table 1 Formulations for the treatments. PL_{TPA}M_{2K}: PPa and L_{TPA} co-encapsulated micelles; L_{TPA}M_{2K}: L_{TPA} encapsulated micelles; PM_{2K}: PPa encapsulated micelles; PBS: Phosphate buffered saline. N/A: Represents not applicable

Group	C _{PPa} /mg·kg ⁻¹	C _{L_{TPA}} /mg·kg ⁻¹
PL _{TPA} M _{2K} +Laser	5.0	2.0
PL _{TPA} M _{2K}	5.0	2.0
L _{TPA} M _{2K}	N/A	2.0
PM _{2K}	5.0	N/A
L _{TPA} M _{2K} +Laser	N/A	2.0
Laser	N/A	N/A
PBS	N/A	N/A

PPa的剂量分别为2和5 mg·kg⁻¹, 光照组用808 nm激光(0.3 W·cm⁻²)照射30 min。从第0天起, 每两天测量1次小鼠体重和肿瘤体积。通过公式计算肿瘤体积(V): $V = (d^2 \times l) / 2$, 其中d和l分别是肿瘤的宽度和长度。给药方案见表1。

统计学方法 实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。所有的数据均使用IBM SPSS 25.0软件进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 分别表示显著、非常显著和极非常显著差异。

结果与讨论

1 载药胶束的表征及体外释放度考察

所制备的BM_{2K}、PM_{2K}、L_{TPA}M_{2K}和PL_{TPA}M_{2K}, 通过激光粒度仪测得平均粒径均约为50 nm, 大小均一。4个胶束样品的平均粒径、包封率、载药量、聚合物分散指数和zeta电位见表2。结果可知, PL_{TPA}M_{2K}的平均粒径最大, 为55.0 ± 5.9 nm。进一步通过透射电子显微镜(TEM)观察发现(图2a、b), 胶束呈类球形, PL_{TPA}M_{2K}的平均粒径约为35.5 ± 6.9 nm。TEM中样品的粒径较DLS测得粒径减小, 这是由于TEM的制样过程中对胶束进

行了干燥, 减少了水合粒径。本胶束粒径小于100 nm, 有利于通过增强渗透滞留(EPR)效应将药物递送至肿瘤^[25]。同时, 胶束表面的PEG嵌段和带有的负电位, 有助于避免被内皮网状系统上的巨噬细胞所吞噬, 延长在血液循环中的时间, 有助于药物在肿瘤的蓄积^[25]。通过紫外-可见吸收光谱在410 nm(L_{TPA})和450、710 nm(PPa)处的吸收峰表明, 双光子化合物L_{TPA}和光敏剂PPa同时包载于胶束PL_{TPA}M_{2K}中(图2c), 经优化后的各胶束对L_{TPA}和PPa的包封率都在85%以上(表2)。PL_{TPA}M_{2K}的PPa和L_{TPA}的体外释放结果(图2d)表明, L_{TPA}和PPa在pH值7.4和5.4的释放介质中释放行为为类似, 说明受pH值影响较小, 8 h后释放变缓, 24 h内几乎全部药物释放完毕。

2 单线态氧测定

使用近红外(near infrared, NIR)光源来实现TP-PDT, 能量从供体L_{TPA}转移到受体PPa之间的FRET过程是必要的。通常需要满足3个条件: 能量供体的发射图谱与受体的吸收图谱能尽可能重叠, 且能量供体具有较大的TPA截面, 以及二者的空间距离应在10 nm以内。经胶束包埋后, L_{TPA}的发射光谱和PPa的吸收光

Table 2 Average particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of micelle samples. BM_{2K}: Blank micelles; EE: Encapsulation efficiency; DL: Drug-loading capacity

Formulation	EE _{PPa} /%	EE _{L_{TPA}} /%	DL _{PPa} /%	D _{L_{TPA}} /%	Size/nm	PDI	Zeta potential/mV
BM _{2K}	N/A	N/A	N/A	N/A	51.5 ± 4.5	0.114	-10.9 ± 0.8
PM _{2K}	92.1 ± 2.8	N/A	3.5 ± 0.5	N/A	52.9 ± 2.8	0.123	-12.5 ± 0.7
L _{TPA} M _{2K}	N/A	94.7 ± 3.5	N/A	3.6 ± 0.3	53.7 ± 3.3	0.118	-12.1 ± 0.4
PL _{TPA} M _{2K}	87.8 ± 2.7	90.3 ± 1.6	3.4 ± 0.6	3.5 ± 0.5	55.0 ± 5.9	0.139	-12.6 ± 0.6

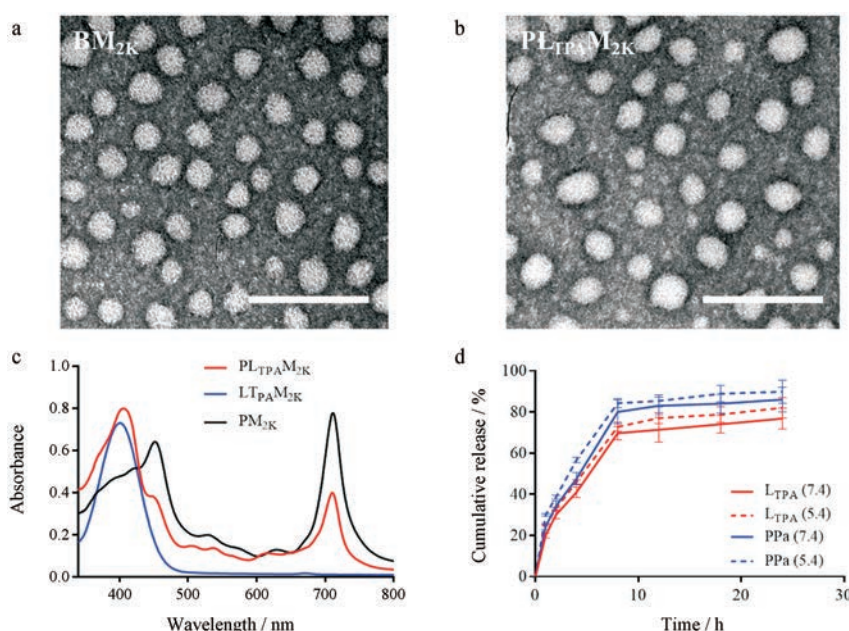


Figure 2 TEM images of BM_{2K} (a) and PL_{TPA}M_{2K} (b), Scale bars represent 200 nm; UV-Vis absorption of PM_{2K}, L_{TPA}M_{2K} and PL_{TPA}M_{2K} (c), *in vitro* release profile of PL_{TPA}M_{2K} at pH 7.4 and pH 5.4 (d)

谱能部分重叠(图3a)。同时,胶束中 L_{TPA} 具有较大的TPA截面,在808 nm处约为1 600 GM,有利于FRET效率的提升。这可能是形成了 π 共轭体系,使得 L_{TPA} 分子中出现电子分布(图3b)。能量供受体 L_{TPA} 和PPa同时被包裹于胶束中,可有效缩小二者之间的空间距离,并且两个药物同步释放,有利于FRET效率的提升,从而提高TP-PDT的疗效。

单线态氧探针ADPA用于进一步测量胶束样品在光照下 1O_2 产生,如图3c所示, $PL_{TPA}M_{2K}$ 在808 nm激光照射下,400 nm处的吸光度值随照射时间延长而下降,在16 min时下降近0.5,且 $PL_{TPA}M_{2K}$ 的 1O_2 产率远高于 $L_{TPA}M_{2K}$ 的 1O_2 产率(图3d)。相较之前工作中^[23]利用PSPMA-PDPA胶束包载 L_{TPA} 、PPa($PL_{TPA}M^*$), $PL_{TPA}M_{2K}$ 大大提高了 1O_2 的产生能力,此现象在对比包埋PPa的 PM_{2K} 和 PM^* 胶束的 1O_2 产率时也进一步得到印证。据文献^[26]报道,胶束内核的疏水能力会根据聚合物(或表面活性剂)疏水嵌段的结构组成不同,而造成疏水程度的差异。此处以聚乳酸为胶束内核时,相较聚2-(二异丙基氨基)乙基甲基丙烯酸酯(PDPA)有更强的疏水性能,避免由于胶束内核的疏水程度不够而导致光敏剂聚集引起的荧光自猝灭,从而提高 1O_2 产率。此外, PM_{2K} 在660 nm激光照射下 1O_2 产率高于 $PL_{TPA}M_{2K}$,在6 min时就能达到近0.5的下降值,这是由于FRET

过程中并未将能量完全转移,造成了部分损耗,但相较 $L_{TPA}M_{2K}$ 组有大量 1O_2 生成,满足杀灭肿瘤细胞的要求^[25],并且本实验中使用的近红外激光能增加对生物组织的穿透深度,有助于降低对皮肤的损伤。

3 体外抗肿瘤活性考察

3.1 肿瘤细胞摄取与TP-PDT效果 利用双光子激光共聚焦显微镜观察4T1小鼠乳腺癌细胞对 PM_{2K} 、 $L_{TPA}M_{2K}$ 和 $PL_{TPA}M_{2K}$ 的摄取,胶束中 L_{TPA} 和PPa都被细胞摄取并主要分布在细胞质中(图4a),两个化合物胞内分布的荧光较为重合。细胞对 $PL_{TPA}M_{2K}$ 在30 min内的实时摄取情况(图4b)表明,细胞中 L_{TPA} 和PPa的荧光强度同时增加。证明此递药系统可使两种化合物同步细胞内化,有利于能量供受体在FRET过程中保持足够近的空间距离,实现胞内TP-PDT。

3.2 细胞毒性与凋亡检测 利用MTT法考察 $PL_{TPA}M_{2K}$ 在有、无光照情况下对4T1细胞的毒性。 PM_{2K} 、PPa和载体材料mPEG₂₀₀₀-PDLLA₂₀₀₀在最大给药浓度未观察到显著的细胞毒性(存活率高于70%)(图5a)。作者前期工作中报道了 L_{TPA} 具有抗癌活性^[22],本研究中 L_{TPA} 对4T1细胞生长亦有明显抑制作用,并且包载入胶束中可以进一步增加其细胞毒性(图5b), $PL_{TPA}M_{2K}$ 的半数抑制浓度($0.105 \pm 0.029 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)显著低于 L_{TPA} 在DMSO中的半数抑制浓度($0.288 \pm 0.073 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

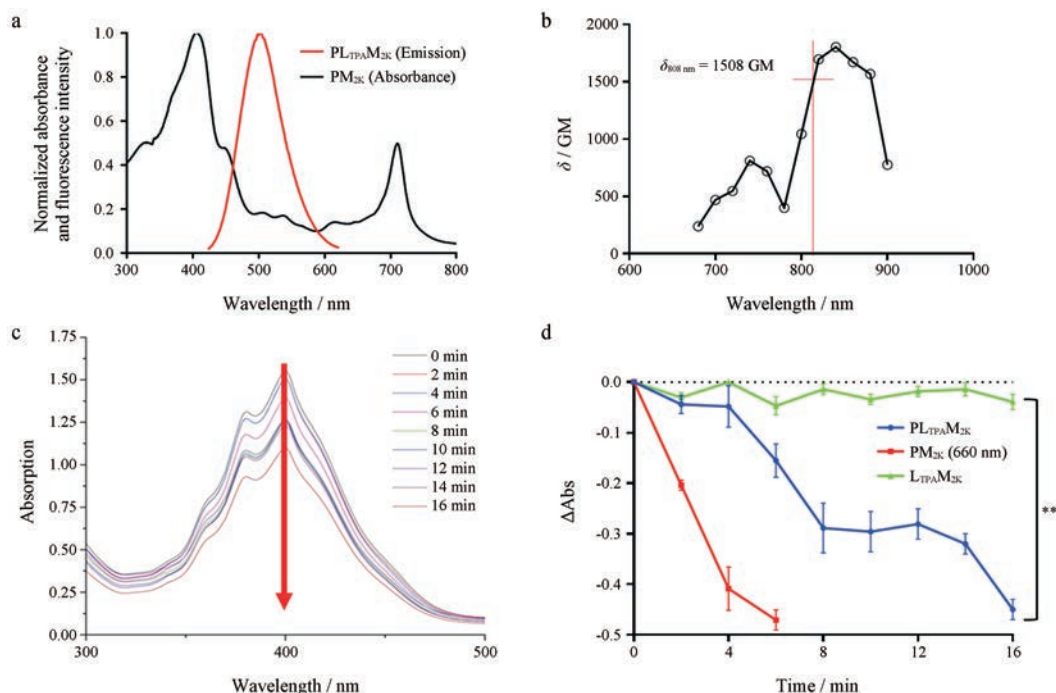


Figure 3 Normalized overlapping of $L_{TPA}M_{2K}$ emission and $PL_{TPA}M_{2K}$ absorption (a); two-photon absorption cross section (δ) of $L_{TPA}M_{2K}$ (b); UV-Vis absorption spectra of $PL_{TPA}M_{2K}$ with anthracene-9,10-dipropionic acid disodium salt (ADPA) exposing under 808 nm laser within 16 mins (c); ΔAbs (absolute decrease value of absorption) of ADPA in different samples irradiating with laser (d). All the samples were irradiated with 808 nm laser except PM_{2K} and PM^* exposed under 660 nm laser. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$

细胞摄取 $PL_{TPA}M_{2K}$ 后, 光照对肿瘤细胞存活率的影响可见, 在功率密度为 $0.3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 808 nm 激光照射 10 min 后, 光照组 ($PL_{TPA}M_{2K}$ +激光) 的细胞存活率显著下降, 低至约 23% , 而对对照组细胞存活率保持在 90% 以上 (图 5c)。为进一步验证 TP-PDT 对细胞存活率的抑制是由活性氧介导的细胞凋亡/坏死所造成, 利用膜联蛋白 V-FITC 和 PI 染色的流式细胞术进行了分析。结果表明, 与空白组晚期凋亡细胞群体 (8.65%) 相比, 对 $PL_{TPA}M_{2K}$ 组光照 10 min 后, 晚期凋亡细胞群体增加至 30.14% (图 6)。表明 TP-PDT 以诱导细胞凋亡/坏死的方式显著降低了肿瘤细胞的存活率。

3.3 胞内活性氧测定 双光子激光共聚焦显微镜观察光照前后活性氧探针 DCFH-DA 绿色荧光信号的变化结果发现, 绿色荧光在 808 nm 激光照射后的激增表明 TP-PDT 使细胞内生产大量活性氧 (图 7)。同时, 在 DIC 即微分干涉相位差通道观察到, 细胞形态在光照后发生明显变化, 在细胞膜和细胞核均出现了起泡、边缘变圆等典型的 PDT 现象 (图 7)。而未给药组, 细胞的形态几乎没有明显变化 (图 8)。结果表明, $PL_{TPA}M_{2K}$ 可在 808 nm 激光激发下进行高效的 TP-PDT, 产生大量活性氧的同时, 迅速破坏肿瘤细胞的生理结构, 直接杀伤肿瘤细胞。

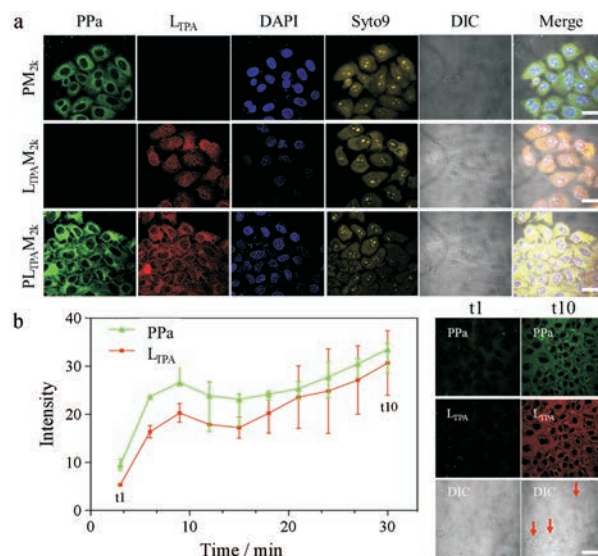


Figure 4 Live 4T1 cells treated with PM_{2K} , $L_{TPA}M_{2K}$ and $PL_{TPA}M_{2K}$ (L_{TPA} : $E_x = 808 \text{ nm}$, $E_m = 505 \text{ nm}$; PPa : $E_x = 610 \text{ nm}$, $E_m = 675 \text{ nm}$), stained with Syto9 ($E_x = 488 \text{ nm}$, $E_m = 503 \text{ nm}$) and DAPI ($E_x = 340 \text{ nm}$, $E_m = 488 \text{ nm}$), DIC is short for differential interference contrast (a); real-time cellular uptake of $PL_{TPA}M_{2K}$ for 30 mins with 10 intervals. The live cell images of first and last time point were displayed as column t1 and t10, respectively, and red arrows indicate typical cell morphology changes after two-photon photodynamic therapy (TP-PDT) (b). $n = 15$, $\bar{x} \pm s$. Scale bars represent $60 \mu\text{m}$

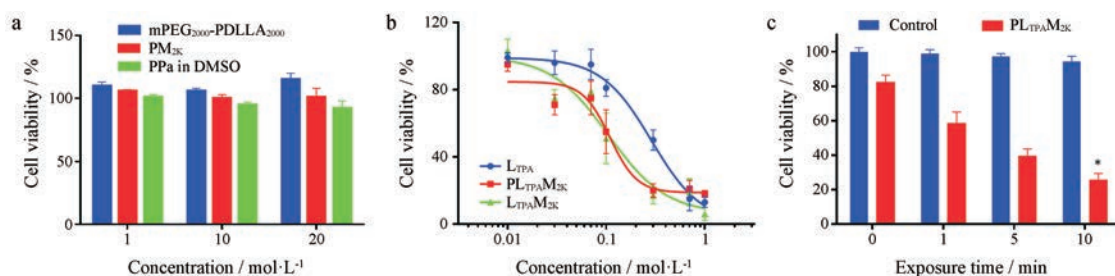


Figure 5 Light off cell viabilities of $mPEG_{2000}$ - $PDLLA_{2000}$, PM_{2K} and free PPa (in DMSO) (a); the viability of 4T1 cells treated with L_{TPA} , $L_{TPA}M_{2K}$ and $PL_{TPA}M_{2K}$ in various concentrations (b); light on cell viabilities of $PL_{TPA}M_{2K}$ treated cells and irradiated with 808 nm laser ($0.3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) (c). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control group

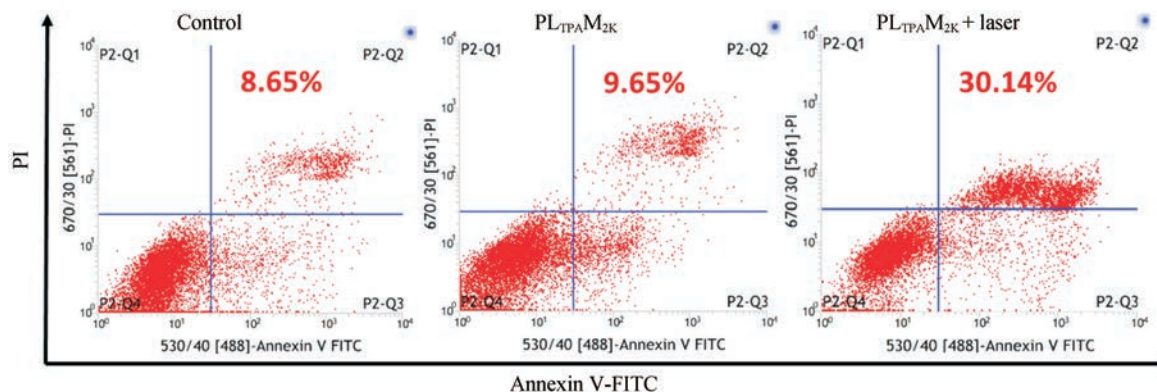


Figure 6 Annexin V-FITC/PI assays analyzing by flow cytometry. P2-Q1, P2-Q2, P2-Q3, P2-Q4 represent population of dead, late apoptotic/necrosis, early apoptotic and viable cells, respectively

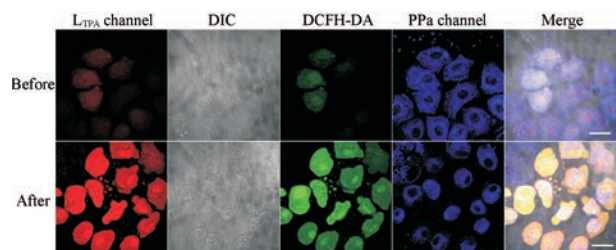


Figure 7 Reactive oxygen species (ROS) generated in cells treated with PL_{TPA}M_{2K} and then irradiated with an 808 nm laser (0.3 W·cm⁻², 30 scans of 10 seconds each). Green fluorescence under two photon confocal microscopy indicated positive staining for ROS probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, E_x = 502 nm, E_m = 523 nm). Scale bars represent 20 μm

4 体内有效性考察

皮下接种4T1小鼠乳腺癌细胞的BALB/c小鼠用于药物离体分布和有效性考察。首先利用PPa的荧光信号进行离体荧光成像观察,发现注射后药物能到达肿瘤部位,并通过EPR效应在肿瘤部位蓄积,约4 h后药物在肿瘤中累积的荧光强度达到最大值。因此,将药效学实验中给予光照的时间点设定为静脉注射后4 h,结果表明,药物的荧光主要分布于肝脏和脾脏中(图9a),推测是由于载药胶束在体循环中对药物的快

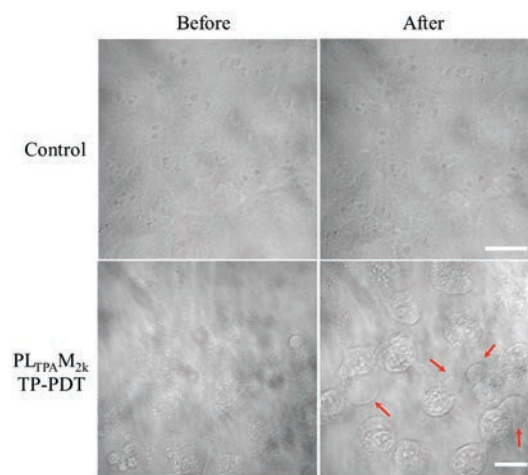


Figure 8 Cell morphology alternations by irradiating with 808 nm laser (0.3 W·cm⁻², 30 scans of 10 seconds each). Scale bars represent 20 μm

速释放造成。后续研究将对聚合物mPEG-PDLLA进行结构改造以提高胶束的靶向效率和体内稳定性。

体内药效考察结果如图9b所示,未加光照的PL_{TPA}M_{2K}和L_{TPA}M_{2K}组由于L_{TPA}自身的抗肿瘤活性,对肿瘤生长有一定的抑制作用。小鼠在注射PL_{TPA}M_{2K}后加以近红外激光照射,对肿瘤生长有明显的抑制作用,

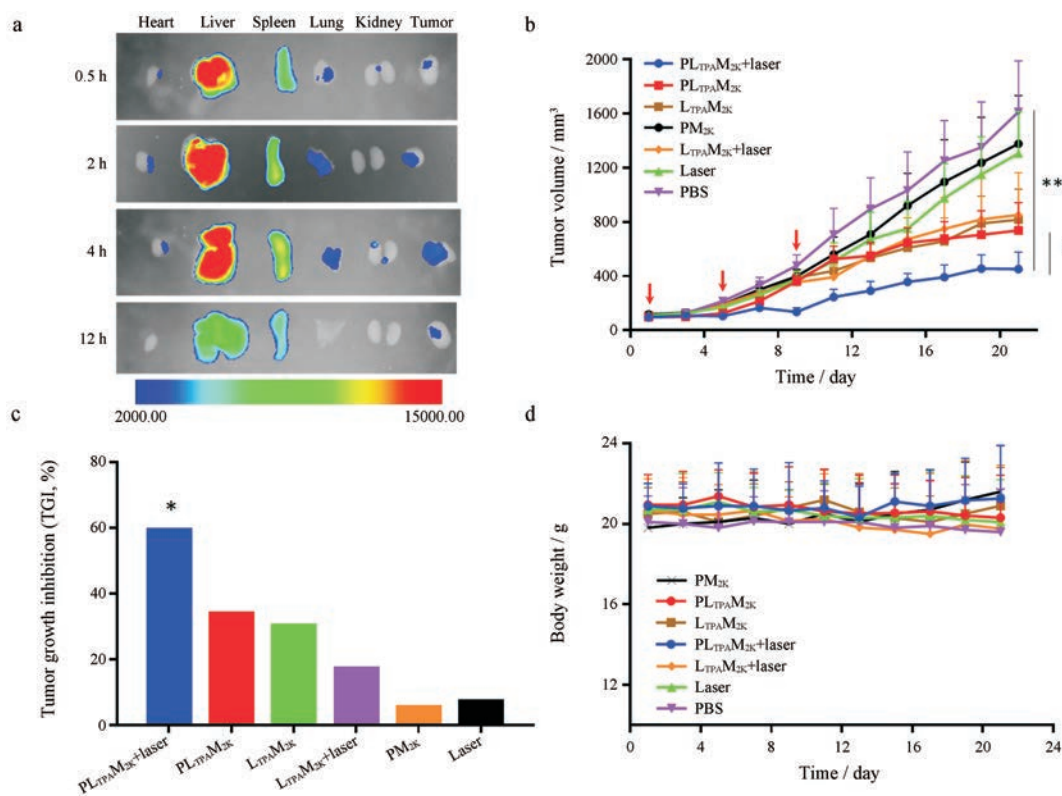


Figure 9 Fluorescent imaging of *ex vivo* organ distribution of PL_{TPA}M_{2K} within 12 hours (E_x = 640 nm, E_m = 710 nm, n = 3) (a); *in vivo* anticancer efficacy of PL_{TPA}M_{2K} against 4T1 xenograft tumors, the red arrows indicate the injection time points. *P<0.05, ***P<0.001 (b); tumor growth inhibition rates. *P<0.05 vs laser group (c); body weight shifting in tumor-bearing mice (d). n = 6, $\bar{x} \pm s$

抑瘤率达到近 60% (图 9c), 此效果是 TP-PDT 与 L_{TPA} 的联合抗肿瘤作用, 且药物的载体在此过程中提高了 L_{TPA} 的水溶性, 增加了其在肿瘤组织中分布, 有利于发挥药效。仅光照组相较于 PBS 组, 对小鼠肿瘤生长有轻微抑制作用, 这可能是光照产生的一定热量对肿瘤生长的影响。如图 9d 所示, 各组小鼠的体重没有显著差别, 表明在实验中载药胶束对小鼠生长无明显影响。目前对 TP-PDT 的研究很多由于溶解性和药物递送的困难, 仅停留在细胞研究阶段, 本研究在不改变光敏剂和双光子化合物结构的前提下, 利用生物可降解的药物载体, 在肿瘤模型动物上进行了 TP-PDT 抗肿瘤药效考察, 并证实其对肿瘤的抑制作用。

结论

本文利用生物可降解的纳米递药系统, 同时装载强双光子吸收化合物和光敏剂, 利用近红外激光 (808 nm) 实现 TP-PDT 抗小鼠乳腺癌。通过胶束的包埋, 减少了供体和受体之间距离, 且胶束中的双光子化合物具有较大的双光子截面, 保证了 FRET 效率, 实现了较高的 1O_2 产率。所用胶束的生物相容性好, 粒径小且表面带负电, $PL_{TPA}M_{2K}$ 可将药物递送至肿瘤。光敏剂和胶束具有较低的细胞毒性, L_{TPA} 对肿瘤细胞生长有抑制作用; 对给药细胞加以 NIR 激光光照时, TP-PDT 对 4T1 细胞产生杀伤作用, 且诱导细胞凋亡坏死。体内有效性实验表明, 载药胶束通过 TP-PDT 和 L_{TPA} 的双重作用有效抑制肿瘤生长, 但其靶向性和体内稳定性还有待进一步提高, 此尝试有助于 TP-PDT 的进一步发展, 也证明 TP-PDT 在抗肿瘤应用上拥有巨大潜力。

References

- [1] Awan MA, Tarin SA. Review of photodynamic therapy [J]. *Surgeon*, 2006, 4: 231-236.
- [2] Paszko E, Ehrhardt C, Senge MO, et al. Nanodrug applications in photodynamic therapy [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2011, 8: 14-29.
- [3] Master A, Livingston M, Sen Gupta A. Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: perspectives and challenges [J]. *J Control Release*, 2013, 168: 88-102.
- [4] Zhang J, Jiang CS, Longo JPF, et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 137-146.
- [5] Hong EJ, Choi DG, Shim MS. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6: 297-307.
- [6] Wang J, Zhang ZH, Zha S, et al. Carbon nanodots featuring efficient FRET for two-photon photodynamic cancer therapy with a low fs laser power density [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 9372-9381.
- [7] Duan XP, Chan C, Guo NN, et al. Photodynamic therapy mediated by nontoxic core-shell nanoparticles synergizes with immune checkpoint blockade to elicit antitumor immunity and antimetastatic effect on breast cancer [J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 16686-16695.
- [8] Kim J, Santos OA, Park JH. Selective photosensitizer delivery into plasma membrane for effective photodynamic therapy [J]. *J Control Release*, 2014, 191: 98-104.
- [9] You H, Yoon HE, Jeong PH, et al. Pheophorbide-a conjugates with cancer-targeting moieties for targeted photodynamic cancer therapy [J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 1453-1462.
- [10] Temizel E, Sagir T, Ayan E, et al. Delivery of lipophilic porphyrin by liposome vehicles: preparation and photodynamic therapy activity against cancer cell lines [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2014, 11: 537-545.
- [11] Gu BB, Pliss A, Kuzmin AN, et al. In-situ second harmonic generation by cancer cell targeting ZnO nanocrystals to effect photodynamic action in subcellular space [J]. *Biomaterials*, 2016, 104: 78-86.
- [12] Kachynski AV, Pliss A, Kuzmin AN, et al. Photodynamic therapy by *in situ* nonlinear photon conversion [J]. *Nat Photonics*, 2014, 8: 455-461.
- [13] Le Dévédec SE, van Roosmalen W, Pont C, et al. Two-photon intravital multicolour imaging to study metastatic behaviour of cancer cells *in vivo* [M] // Wells CM, Parsons M. *Cell Migration*. New York: Humana Press, 2011, 769: 331-349.
- [14] Zhang Q, Luo JS, Ye LL, et al. Design, synthesis, linear and nonlinear photophysical properties and biological imaging application of a novel Λ -type pyrimidine-based thiophene derivative [J]. *J Mol Struct*, 2014, 1074: 33-42.
- [15] Zhang Q, Luo L, Xu H, et al. Design, synthesis, linear and nonlinear photophysical properties of novel pyrimidine-based imidazole derivatives [J]. *New J Chem*, 2016, 40: 3456-3463.
- [16] Pawlicki M, Collins HA, Denning RG, et al. Two-photon absorption and the design of two-photon dyes [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 3244-3266.
- [17] Floyd JA, Galperin A, Ratner BD. Drug encapsulated polymeric microspheres for intracranial tumor therapy: a review of the literature [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 91: 23-37.
- [18] Dichtel WR, Serin JM, Edder C, et al. Singlet oxygen generation via two-photon excited FRET [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 5380-5381.
- [19] Ouahab A, Cheraga N, Onoja V, et al. Novel pH-sensitive charge-reversal cell penetrating peptide conjugated PEG-PLA micelles for docetaxel delivery: *in vitro* study [J]. *Int J Pharm*, 2014, 466: 233-245.
- [20] Garofalo C, Capuano G, Sottile R, et al. Different insight into amphiphilic PEG-PLA copolymers: influence of macromolecular

- architecture on the micelle formation and cellular uptake [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15: 403-415.
- [21] Hu QY, Gu GZ, Liu ZY, et al. F3 peptide-functionalized PEG-PLA nanoparticles co-administrated with tLyp-1 peptide for anti-glioma drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 1135-1145.
- [22] Zhao XS, Liu J, Wang H, et al. Synthesis, crystal structures and two-photon absorption properties of triphenylamine cyanoacetic acid derivative and its organooxotin complexes [J]. *Dalton Trans*, 2015, 44: 701-709.
- [23] Luo L, Zhong H, Liu S, et al. Intracellular "activated" two-photon photodynamic therapy by fluorescent conveyor and photosensitizer co-encapsulating pH-responsive micelles against breast cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 5189-5201.
- [24] Feng XY, Yao JH, Gao XL, et al. Multi-targeting peptide-functionalized nanoparticles recognized vasculogenic mimicry, tumor neovasculature, and glioma cells for enhanced anti-glioma therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 27885-27899.
- [25] Albota MA, Xu C, Webb WW. Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm [J]. *Appl Opt*, 1998, 37: 7352-7356.
- [26] Maibaum L, Dinner AR, Chandler D. Micelle formation and the hydrophobic effect [J]. *J Phys Chem B*, 2004, 108: 6778-6781.