

键合光敏剂的铂基聚吡咯用于氧气增强的光动力治疗

张越¹, 李晗玥², 曾伟健³, 梅林^{2*}, 陈大全^{1*}

(1. 烟台大学药学院, 分子药理和药物评价教育部重点实验室(烟台大学), 新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心, 山东烟台 264005; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院生物医学工程研究所, 先进医用材料与医疗器械全国重点实验室, 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192; 3. 宁波大学科学技术学院, 浙江宁波 315212)

摘要: 光动力治疗是一种具有临床前景的新兴癌症治疗方法, 可以特异地在肿瘤部位发挥作用并且对人体的伤害较小, 但是疏水性光敏剂小分子的毒性、肿瘤的乏氧微环境及纳米载药系统的生物降解性等影响了其抗肿瘤疗效和体内代谢清除。本文利用六氯铂酸作为新型氧化剂成功引发吡咯/氨基吡咯的氧化聚合, 实现了其表面氨基功能化; 进一步通过还原剂硼氢化钠还原纳米结构中铂酸阴离子为铂纳米簇, 制得铂纳米簇掺杂的聚吡咯纳米粒子(platinum nanocluster-doped polypyrrole nanoparticles, PtPPy); 最后通过酰胺键偶连光敏剂四(4-羧基苯基)卟吩[meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphine, TCPP], 获得递送 TCPP 的功能性纳米药物(PtPPy@T)。该纳米药物为球型结构, 形态均匀, 粒径为 91.93 ± 13.45 nm, zeta 电位为 -18.39 ± 1.4 mV。实验证明, PtPPy@T 可与肿瘤过表达的过氧化氢发生反应, 产生大量的氧气, 改善肿瘤乏氧微环境, 同时为随后的光动力治疗提供充足的反应基板; 使用 658 nm 激光照射肿瘤组织, 激活 PtPPy@T 的光动力效应, 催化氧气转化为单线态氧, 从而引发肿瘤细胞的氧化损伤并诱导其凋亡; 实验研究表明该 PtPPy@T 纳米药物在体内和体外都有较好的肿瘤抑制效果。所有动物实验均经中国医学科学院、北京协和医学院放射医学研究所机构动物护理和使用委员会批准(IRM/2-IACUC-2312-006)。

关键词: 聚吡咯; 纳米药物; 光动力治疗; 肿瘤乏氧; 氧化损伤

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)07-2153-08

Platinum-based polypyrrole is used in oxygen-enhanced photodynamic therapy

ZHANG Yue¹, LI Han-yue², ZENG Wei-jian³, MEI Lin^{2*}, CHEN Da-quan^{1*}

(1. Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation (Yantai University), Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. State Key Laboratory of Advanced Medical Materials and Devices, Tianjin Key Laboratory of Biomedical Materials, Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China; 3. College of Science and Technology, Ningbo University, Ningbo 315212, China)

Abstract: Photodynamic therapy is an emerging cancer therapy with clinical prospects, which plays a specific role in the tumor site and causes less harm to the human body. However, the toxicity of small molecules of hydrophobic photosensitizer, the tumor hypoxia microenvironment, and the biodegradability of nano-carrier systems affect its antitumor efficacy and metabolic clearance *in vivo*. In this paper, hexachloroplatinic acid was used as a novel oxidizing agent to initiate oxidative polymerization of pyrrole/amino pyrrole to achieve the amino

收稿日期: 2024-03-18; 修回日期: 2024-04-15.

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项(2022YFE0139800); 天津市杰出青年基金项目(22JCJQC00120).

*通讯作者 Tel: 18665387360, E-mail: meilin@bme.pumc.edu.cn;

Tel: 13853525397, E-mail: cdq1981@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0245

functionalization; further reduced platinum acid anion in the nanostructures into platinum nanoclusters by sodium borohydride as a reducing agent to fabricate platinum nanocluster-doped polypyrrole nanoparticles (PtPPy); and finally, this functional nanoparticles delivering *meso*-tetra (4-carboxyphenyl) porphine (TCPP) were obtained by amide-bonded coupling of photosensitizers TCPP drug (PtPPy@T). The nanomedicine had a spherical structure, uniform morphology, a particle size of 91.93 ± 13.45 nm, and a zeta potential of -18.39 ± 1.4 mV. Experiments demonstrated that PtPPy@T could react with hydrogen peroxide overexpressed in the tumor to generate a large amount of oxygen, which could relieve the tumor hypoxia microenvironment, and at the same time, provided a sufficient substrate for the subsequent PDT; using 658 nm laser irradiation, the photodynamic effect of PtPPy@T was activated, which catalyzed the conversion of oxygen to singlet oxygen, thus triggering oxidative damage and inducing apoptosis in tumor cells; experimental studies showed that the PtPPy@T nanomedicine had a better tumor inhibitory effect *in vivo* and *in vitro*. All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute of Radiological Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College (IRM/2-IACUC-2312-006).

Key words: polypyrrole; nano-drug; photodynamic therapy; tumor hypoxia; oxidative damage

近年来, 癌症的发病率与死亡率都在逐步上升, 目前临床上治疗癌症的手段主要是手术切除、放疗和化疗, 但这几种治疗手段的作用方式是直接且剧烈的, 缺乏响应性激活肿瘤杀伤毒性的功能, 因此发展一种具有刺激响应性的新型治疗手段具有较大的社会意义^[1,2]。作为一种无创、可重复性高的新型癌症治疗手段, 光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 是指光敏剂在特定波长的激光照射下, 将氧气 (oxygen, O₂) 转化为具有细胞毒性的活性氧, 从而起到治疗作用的一种疗法, 有效减少了对非激光照射组织/细胞的毒副作用, 目前已被广泛应用于皮肤疾病等临床治疗中, 并在多种小鼠肿瘤模型中表现出良好的肿瘤杀伤能力^[3,4]。然而, 传统光敏剂亲水性差、生物相容性差、靶向性不佳等特点, 极大地限制了其体内循环、分布、病灶部位富集及 PDT 抗肿瘤效果^[5]。此外, O₂ 是发挥 PDT 的前提条件之一, 而肿瘤乏氧的微环境使 PDT 治疗过程面临反应基板供应不足的难题, 很大程度上减弱 PDT 的疗效^[6]。因此, 改善肿瘤乏氧和提高小分子光敏剂的体内输送是增强 PDT 的有效策略。据报道, 天然的过氧化氢酶可以催化肿瘤过表达的过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 生成 O₂, 例如刘庄团队^[7]使用氟化聚乙烯亚胺纳米材料成功递送过氧化氢酶至肿瘤组织, 有效缓解肿瘤乏氧微环境, 增强 PDT 疗效。此外, 氧化铁、二氧化锰、铂量子点等纳米材料具有类过氧化氢酶活性, 可催化肿瘤内 O₂ 的产生^[8,9]。相较于天然的过氧化氢酶, 基于纳米材料的纳米酶来源丰富, 制备储存简单, 且经济成本低。其中, 铂量子点尺寸普遍在 10 nm 以内, 在发挥类酶活性后降解产物主要为各种铂酸或铂纳米超小片段, 比较容易通过肾脏途径代谢排出机体, 具有较高的生物安全性^[10]。

聚吡咯 (polypyrrole, PPy) 是一种常见的杂环共轭型导电高分子聚合物, 主要通过吡咯单体或单体衍生物在电化学或氧化剂的协助下氧化聚合制得, 具有良好的生物相容性、稳定性、导电性及较强的光学吸收和光热转换效率^[11]。虽然 PPy 在组织工程、传感器、光热抗肿瘤等领域显示出明显的优势和应用前景, 但其作为药物递送载体的研究尚处在初期: ① 非孔洞的纳米结构限制了其药物装载能力; ② 表面缺乏功能性基团, 难以通过化学修饰的方式固定药物; ③ 单一的 π - π 共轭弱作用力偶联药物的方式不稳定, 易发生药物的解离^[12]。此外, 大多数研究人员对 PPy 氧化聚合过程中的氧化剂和稳定剂组件进行设计和优化, 以期通过改善 PPy 的理化性质、生理活性和/或赋予 PPy 新的治疗功能来增强抗肿瘤疗效和生物安全性。例如, 梅林教授团队^[13]使用氯化铜作为新型氧化剂成功制得多价铜掺杂的 PPy, 有效诱导肿瘤组织/细胞的氧化应激, 并激活机体免疫。遗憾的是, PPy 纳米结构中的另一关键组件, 即与带正电荷的吡咯自由基配位的阴离子, 却少有人关注。值得注意的是, 掺杂的阴离子遍布整个纳米结构, 是影响 PPy 纳米结构稳定性和降解行为的重要因素^[14]。研究表明, 高价态的阴离子可以在还原剂的作用下还原为相应的纳米簇, 如四氯铂酸在硼氢化钠作用下还原为铂纳米簇或量子点^[15]。相比于铂酸阴离子, 铂纳米簇或量子点具有更多的功能性, 如上述的类酶活性催化产生 O₂ 并可促进自身降解^[16]。因此, 开发纳米簇或量子点掺杂的 PPy 是实现多功能化和体内代谢降解的策略之一^[17]。

本文利用六氯铂酸作为新型氧化剂成功引发吡咯/氨基吡咯的氧化聚合, 实现其表面氨基功能化; 进一步通过还原剂硼氢化钠还原纳米结构中铂酸阴离子

为铂纳米簇, 制得铂纳米簇掺杂的聚吡咯纳米粒子 (PtPPy); 最后通过酰胺键偶联光敏剂四 (4-羧基苯基) 吡吩 (*meso*-tetra (4-carboxyphenyl) porphine, TCPP), 获得递送 TCPP 的功能性纳米药物 (PtPPy@T)。该纳米药物为球型结构, 形态均匀, 粒径为 91.93 ± 13.45 nm, zeta 电位为 -18.39 ± 1.4 mV。实验证明, PtPPy@T 可与肿瘤过表达的 H_2O_2 发生反应产生大量的 O_2 , 改善肿瘤乏氧微环境, 同时为随后的光动力治疗提供充足的反应基板; 使用 658 nm 激光照射肿瘤组织, 激活 PtPPy@T 的光动力效应, 催化 O_2 转化为单线态氧 (singlet oxygen, 1O_2), 从而引发肿瘤细胞的氧化损伤并诱导其凋亡; 实验研究表明, 该 PtPPy@T 纳米药物在体内和体外都有较好的肿瘤抑制效果。

材料与方法

试剂 聚乙烯醇 0588 低黏度型 (PVA-205) (P105128)、吡咯 (P104879)、氨基吡咯 (1H-pyrrol-1-amine, A151234)、六氯铂酸 (chloroplatinic acid, H_2PtCl_6 , C120776)、四 (4-羧基苯基) 吡吩 (TCPP, P355184)、亚甲基蓝 (methylene blue, MB, M134389)、*N*-羟基琥珀酰亚胺 (*N*-hydroxysuccinimide, NHS, H109330)、*N*-(3-二甲氨基丙基)-*N'*-乙基碳二亚胺盐酸盐 (*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC, E106772) 和硼氢化钠 ($NaBH_4$, S108355) (上海阿拉丁生物化学技术有限公司); 1,3-二苯异苯并呋喃 (1, 3-diphenylisobenzofuran, DPBF, 105481) [西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司]; 细胞增殖/毒性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8, K1018, 美国 APE×BIO 公司); 胰酶消化液 (R001100)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, A5669701)、1640 培养基 (roswell park memorial institute, 1640, 11875093)、青霉素、链霉素 (15070063) 和磷酸缓冲生理盐水缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS, G4207) (塞维尔生物科技有限公司); Hoechst 33342 染色液 (C0031)、2',7'-二氯荧光素双醋酸酯 (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA, D6470) (北京索莱宝科技有限公司); 三(4,7-联苯-1,10-邻菲罗啉)二氯化钌 [Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) ruthenium (II) dichloride], $[Ru(dpp)_3]Cl_2$, MX4826) (上海懋康生物科技有限公司)。

仪器 动态光散射粒度分析仪 (ZEN3590, 英国 Malvern 公司); 658 nm 光纤激光器 (LL658-3600mw, 长春新产业广电有限公司); 便携式溶氧仪 (JPB-608A, 杭州齐威仪器有限公司); 紫外分光光度计 (UH5700, 日本日立公司); 数控超声波清洗器 (KQ-500DB, 昆山市超声仪器有限公司); 傅立叶变换红外光谱仪 (Nicolet

IS10)、细胞培养箱 (Midi 40, 美国 ThermoFisher); 倒置荧光显微镜 (CKX53, 日本奥林巴斯公司); 共聚焦激光扫描显微镜 (LSM 900, 德国蔡司)。

细胞与动物 雌性 Balb/c 小鼠, SPF 级, 4~6 周龄, 20~22 g, 合格证号: 110324241101160947, 许可证号: SCXK (京) 2019-0010, 来自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司。所有动物实验均经中国医学科学院、北京协和医学院放射医学研究所机构动物护理和使用委员会批准 (IRM/2-IACUC-2312-006)。

PtPPy@T 纳米粒子的制备 首先, 将 50 mg PVA 和 10 mL 去离子水加入圆底烧瓶中, 然后加热至 90 °C 并搅拌 1 h 使其溶解, 自然冷却至室温后, 将 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2PtCl_6 注入混合物中并搅拌 10 min, 然后先后加入 60 μL 吡咯和 60 μL 氨基吡咯, 搅拌 6.5 h, 得到氨基功能化的铂酸掺杂的聚吡咯; 最后, 向混合物中加入 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ $NaBH_4$ 用来引发还原反应, 在温和搅拌下继续反应 3 h。利用高速离心提取产物, 用去离子水洗涤 3 次, 得到氨基功能化的铂纳米簇掺杂的聚吡咯纳米粒子 (PtPPy)。

纳米粒子的形貌大小分析 通过高分辨率透射电子显微镜 (high resolution transmission electron microscope, HRTEM) 分析纳米颗粒形貌。动态光散射粒径分析仪 (dynamic light scattering, DLS) 用于监测流体动力学颗粒尺寸和 zeta 电位。将合成好的纳米粒子分散在水溶液中, 使用探头超声使其分散完全, 然后吸取 10 μL 滴至铜网上, 待其完全干燥后用 HRTEM 进行观察。用 DLS 对纳米粒子的流体动力学粒径及 zeta 电位进行分析。

纳米粒子紫外光谱的测定 采用紫外-可见分光光度计测定 TCPP、PtPPy 和 PtPPy@T 在去离子水溶液中的紫外可见光谱 (ultraviolet-visible spectra, UV-vis)。取适量的 TCPP、PtPPy 和 PtPPy@T 分别分散于去离子水中, 在 200~1 000 nm 处测量紫外吸收。

纳米粒子红外光谱的测定 分别取适量 TCPP、PtPPy 和 PtPPy@T 的冻干粉加入至研钵中, 然后加入溴化钾并一起研磨成粉末, 再对其进行压片处理, 最后使用傅立叶变换红外光谱仪 (Fourier transform infrared spectrometer, FTIR) 测量。

纳米粒子产氧能力 采用便携式溶解氧仪测定 Pt@PtP-T 的产氧能力。分别将 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TCPP、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PtPPy 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PtPPy@T 溶解于 10 mL PBS 中, PBS 作为对照组。然后每个组加入 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 , 在温和搅拌条件下, 使用便携式溶解氧仪每 10 s 检测混合物中溶解氧的质量浓度。

纳米粒产 1O_2 能力 分别将 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TCPP 和

25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PtPPy@T (TCPP 为 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 溶解于 10 mL PBS 中, PBS 作为对照组。然后每个组加入 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 和 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DPBF。设置 658 nm 光纤激光器的功率为 300 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 每照射 2 min 立即用紫外分光光度计进行测量, 共照射 10 min。每组做 3 次平行实验。

细胞培养 小鼠乳腺癌细胞 (mouse breast cancer cells, 4T1) 在含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗青霉素/链霉素的 1640 培养基中培养, 置于含 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养。

细胞毒性检测 使用 CCK-8 试剂盒评估 PtPPy@T 的细胞毒性。将 4T1 细胞以密度为每孔 5×10^3 个细胞接种到 96 孔板中, 再将其放置于细胞培养箱中孵育过夜。然后吸出原先旧培养基, 加入含有不同质量浓度 PtPPy@T (0、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的新鲜培养基, 继续孵育 24 或 48 h。待孵育完成后吸出旧培养基并用 PBS 缓冲液洗涤两次, 最后用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性。为了进一步评估 PtPPy@T 在常氧或乏氧培养条件下对肿瘤细胞的光动力毒性, 4T1 细胞首先与不同质量浓度的 PtPPy@T (0、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 共同孵育 4 h。随后, 这些细胞暴露在波长为 658 nm 的光纤激光器下, 激光的功率为 0.3 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 照射时间为 5 min, 继续孵化 24 h。之后用 PBS 冲洗两次, 用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性。

细胞内产氧能力 将 4T1 细胞以每皿 1.5×10^5 个细胞的密度接种在共聚焦培养皿中并孵育过夜。吸出旧培养基, 加入含有 $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$ 探针 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的新鲜 1640 培养基, 并放入细胞培养箱中继续孵育 2 h。待孵育完成后取出培养皿, 用 PBS 洗涤两次。然后分别用纯 1640 培养基、TCPP (3.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 PtPPy@T (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 孵育 4 h, 对于激光照射组, 使用功率为 300 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的 658 nm 光纤激光器照射 5 min, 然后继续放入培养箱中孵育 12 h。最后吸去旧培养基, 使用 Hoechst 33342 染料对细胞核染色, 再利用共聚焦显微镜获得图像。

细胞内产 $^1\text{O}_2$ 能力 将 4T1 细胞以每皿 1.5×10^5 个细胞的密度接种在共聚焦培养皿中并在常氧或乏氧培养环境中孵育过夜。然后吸出旧培养基, 分别将纯 1640 培养基、PtPPy、TCPP (3.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 PtPPy@T (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 加入共聚焦培养皿中, 继续孵育 4 h。对于需要激光处理的细胞, 使用 658 nm 光纤激光器 (300 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) 对其照射 5 min, 然后放入培养箱中继续培养 2 h, 最后替换含有 DCFH-DA (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 1640 培养液孵育 30 min, 用共聚焦显微镜显像。

抑瘤实验 当 4T1 荷瘤小鼠的肿瘤体积达到

80 mm^3 时, 对所有荷瘤小鼠进行随机分组: ① PBS 组, ② PtPPy@T 组, ③ TCPP + L 组, ④ PtPPy@T + L 组。TCPP 和 PtPPy@T 的给药剂量分别为 2 和 25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。对于需要激光照射的组别, 在 12 h 后使用 658 nm 的光纤激光器 (300 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) 照射小鼠肿瘤部位 5 min。每两日测量一次小鼠的肿瘤体积及体重, 共记录 16 天。

统计学方法 所有数据分析均通过 OriginPro 软件完成, 数据表示为平均值 \pm 标准误差 ($\bar{x} \pm s$), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果与讨论

1 纳米粒子的制备与表征

利用动态光散射法和高分辨率透射电子显微镜对 PtPPy@T 纳米粒子进行观察, 结果显示纳米粒子的大小比较均一, 流体动力学粒径为 91.93 ± 13.45 nm (图 1A)。表面电位结果显示 PtPPy@T 纳米粒子的 zeta 电位为 -18.39 ± 1.4 mV, 而 PtPPy 纳米粒子的 zeta 电位为 -10.1 ± 0.2 mV, 通过电位的变化可以初步证明 TCPP 成功键合在 PtPPy 纳米粒子表面 (图 1B)。PtPPy@T 纳米粒子的元素映射图谱结果显示, C、N、O 和 Pt 元素均匀分布在纳米结构中 (图 1C)。为了进一步验证 TCPP 的键合情况, 对 PtPPy@T 的 FTIR 进行测定, 如图 1D 所示, TCPP 的 C=C 键和 C=O 键的拉伸振动分别归属于 PtPPy@T 中 1 600 和 1 697 cm^{-1} 处的吸收峰, 证明 PtPPy@T 的成功制备。从图 1E 中的 UV-vis 光谱可以看出, 与 PtPPy 相比, PtPPy@T 的 UV-vis 在 400 nm 处有一个与 TCPP 一致的特征吸收峰, 这为 TCPP 的成功键合再次提供了证据。

使用便携式溶氧仪考察了 PtPPy@T 产生 O_2 的能力, 如图 2A 所示, 与对照组相比, TCPP + H_2O_2 组中溶解氧的含量没有上升, 说明单独的 TCPP 没有产氧能力。而 PtPPy + H_2O_2 与 PtPPy@T + H_2O_2 组显示出持续的 O_2 产生, 说明 PtPPy 纳米载体具有良好的产氧能力, 很好证实 PtPPy@T 纳米粒子中的铂纳米簇具有类过氧化氢酶活性, 能够与 H_2O_2 反应产生 O_2 。随后进一步探究 PtPPy@T 产 $^1\text{O}_2$ 的能力。DPBF 探针与 $^1\text{O}_2$ 可发生不可逆氧化, 氧化后导致其在 420 nm 处的紫外特征吸收峰有所下降, 因此可以利用 DPBF 探针检测 PtPPy@T 纳米粒子催化 $^1\text{O}_2$ 产生的能力。如图 2B 所示, 在 658 nm 激光 (300 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 2 min) 照射下 PtPPy@T + H_2O_2 组在 420 nm 处的 DPBF 特征吸收峰下降最为显著, 这说明 PtPPy@T 与单独 TCPP 相比具有更好的光催化活性, 进一步证明 PtPPy 纳米载体可以发挥类过氧化氢酶活性催化生成 O_2 , 从而增强光动力治疗的疗效。

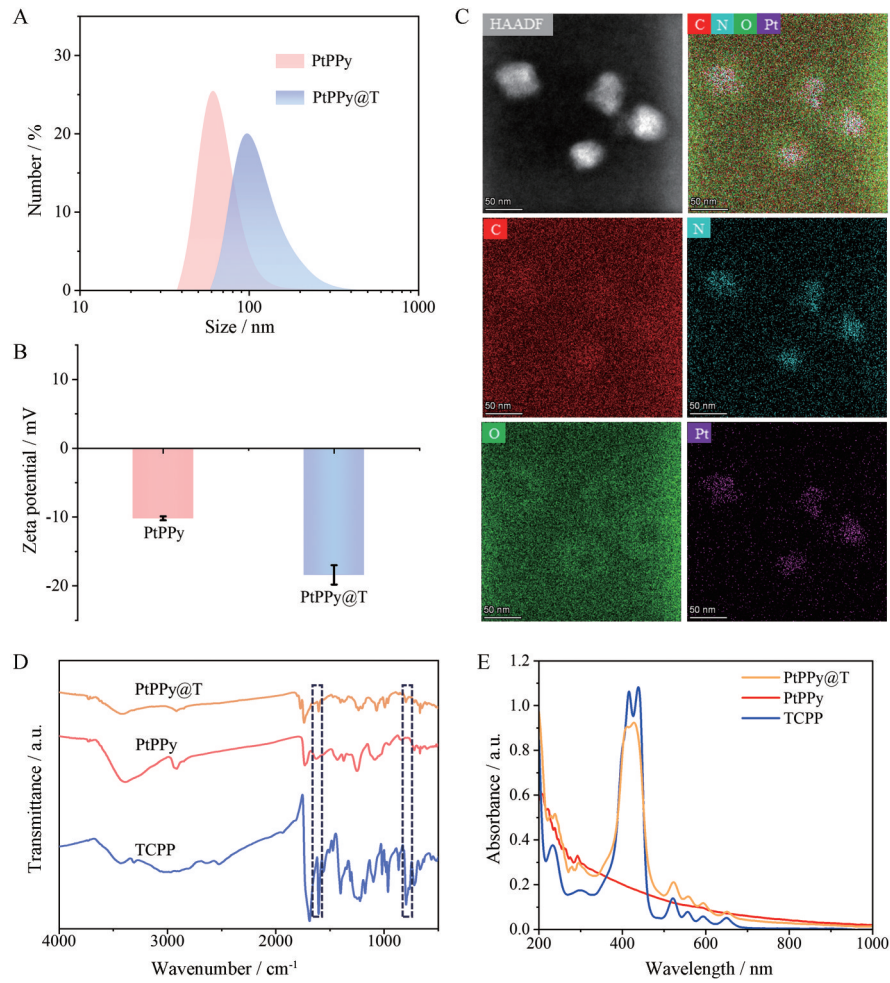


Figure 1 Synthesis and characterizations of PtPPy@T. A: Hydrodynamic size of PtPPy and PtPPy@T; B: Zeta potential of PtPPy and PtPPy@T, $n = 3$; C: Element mappings of PtPPy@T; D: FTIR spectra of TCPP, PtPPy, and PtPPy@T; E: UV-vis spectra of TCPP, PtPPy, and PtPPy@T

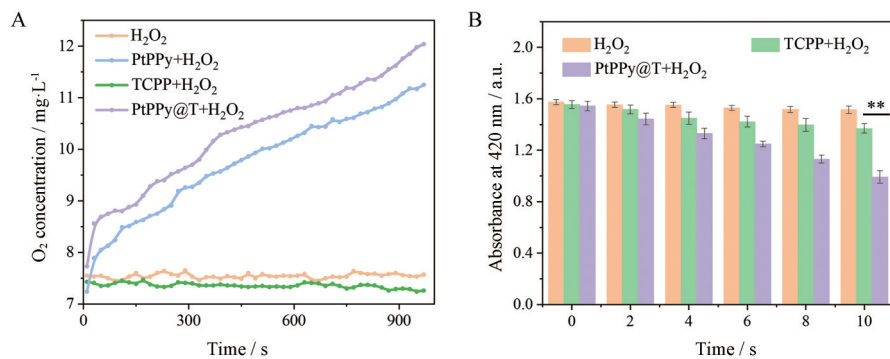


Figure 2 The ability of PtPPy@T to produce O_2 and 1O_2 . A: O_2 production capacity of TCPP, PtPPy, and PtPPy@T in the presence of H_2O_2 ; B: 1O_2 production capacity of TCPP and PtPPy@T under laser irradiation. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$

2 PtPPy@T 纳米粒在细胞水平的功效研究

使用 CCK-8 法评估 PtPPy@T 纳米粒子的细胞毒性, 从图 3A 的结果可以看出, 在没有激光照射时, PtPPy@T 纳米粒子即使在较高的质量浓度 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 下也没有表现出明显的细胞毒性, 证明其具有良好的生物

相容性。本文还考察 PtPPy@T 纳米粒子在常氧或乏氧条件下对肿瘤细胞的光动力毒性。图 3B 结果显示, 在常氧条件下, 经 PtPPy@T 处理和 658 nm 激光 ($300 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$, 5 min) 照射后的肿瘤细胞活性明显下降, 并且随着纳米粒子质量浓度的增加, 细胞活性持续

下降,说明PtPPy@T在常氧和激光照射条件下具有较强的肿瘤杀伤作用。而在乏氧条件下,PtPPy@T的光动力杀伤效果有所减弱,归因于不足的氧气供应,从而影响了光动力治疗疗效。

本文考察了PtPPy@T纳米粒子在细胞水平产生 O_2 与 1O_2 的能力。首先使用 $[Ru(dpp)_3]Cl_2$ 探针测定细胞内 O_2 的生成,该探针可以与 O_2 发生反应从而引起其自身红色荧光信号的降低。如图4A所示,经PtPPy@T处理后的4T1细胞内的荧光信号显著降低,说明PtPPy@T纳米粒子通过类酶活性缓解肿瘤细胞乏氧微环境,能够为光动力治疗提供充足的 O_2 供应。值得注意的是,相较于非激光照射组(control和PtPPy@T),

激光照射组(TCPP + L和PtPPy@T + L)显示出更强的红色荧光信号,说明PDT过程需要 O_2 底物的消耗,而PtPPy@T的产氧能力一定程度上为PDT提供更多的反应底物。随后,使用DCFH-DA检测PtPPy@T在细胞内的 1O_2 产生能力,该荧光探针可以与 1O_2 发生反应进而表现出绿色荧光。如图4B所示,control组与PtPPy@T组的细胞均没有观测到绿色荧光,即这些组中没有 1O_2 生成,在TCPP + L组中出现较为微弱的绿色荧光,证明光敏剂TCPP可以通过光动力产生 1O_2 ,PtPPy@T + L组中出现较强的绿色荧光,该结果证明PtPPy@T纳米粒子相比单纯TCPP来说在细胞内具有更强的 1O_2 产生能力,再次说明了PtPPy@T纳米粒子

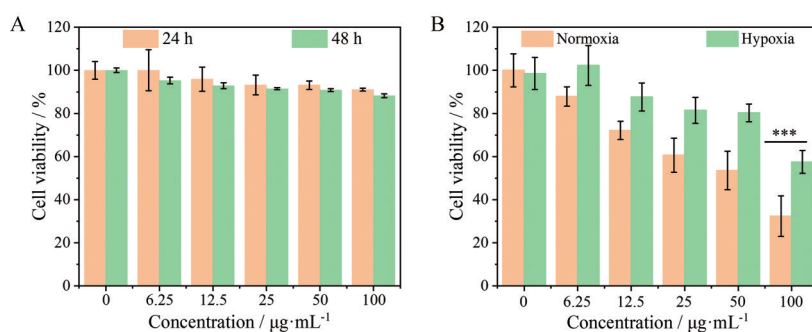


Figure 3 Cytotoxicity of PtPPy@T. A: Relative viability of 4T1 cancer cells after treatment with different concentrations of PtPPy@T for 24 or 48 h; B: Relative viability of 4T1 cancer cells after PtPPy@T treatment and 658 nm laser irradiation ($0.3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$, 5 min) under normoxia or hypoxia conditions. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$

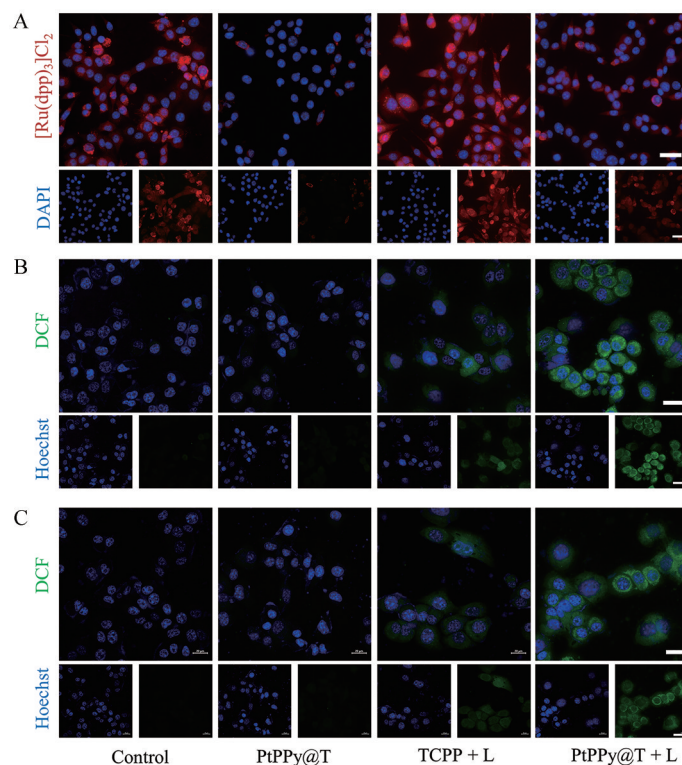


Figure 4 O_2 and 1O_2 production in 4T1 cells. A: O_2 production after different treatments; B: 1O_2 production after different treatments under normoxia conditions; C: 1O_2 production after different treatments under hypoxic conditions. Scale bar: 20 μm

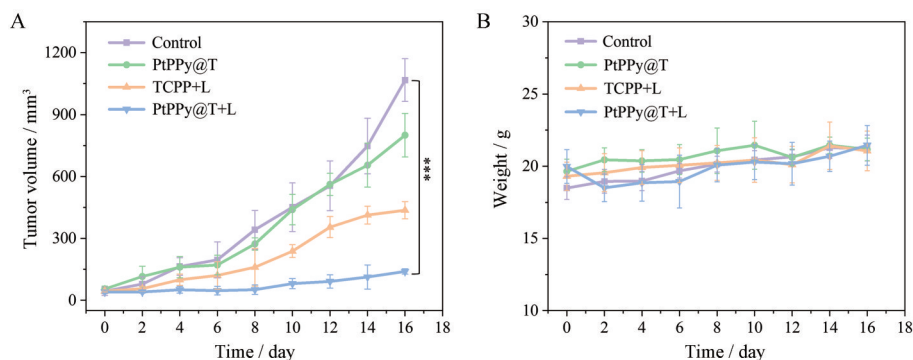


Figure 5 Tumor suppression *in vivo*. A: Tumor growth curves of 4T1 tumor-bearing Balb/c mice receiving different treatments; B: Body weight of 4T1 tumor-bearing Balb/c mice receiving different treatments. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$

通过类酶活性产氧可增强 PDT 疗效。而 TCPP + L 和 PtPPy@T + L 实验组在乏氧培养条件下均呈现出较弱的绿色荧光, 表明氧气的供应与 $^1\text{O}_2$ 产生是息息相关的, 氧气的不足减弱光动力治疗疗效 (图 4C)。

3 抑瘤实验

对荷瘤的 Balb/c 小鼠进行分组, 给予不同的制剂 (control、PtPPy@T、TCPP + L、PtPPy@T + L) 进行治疗, 评估 PtPPy@T 纳米粒子在动物水平的抑瘤效果。研究发现, control 组和 PtPPy@T 组中的小鼠肿瘤生长的速度较快, TCPP + L 组中的小鼠肿瘤生长速度虽有所减慢但仍在持续增长, 说明单纯 TCPP 治疗效果有限, 原因可能是小分子光敏剂亲水性差、肿瘤富集效果弱及肿瘤乏氧环境的限制 (图 5A)。而 PtPPy@T + L 治疗组能显著地抑制小鼠肿瘤的生长, 肿瘤体积几乎没有增大的趋势, 说明氧气增强的 PDT 治疗策略具有显著的抑瘤效果。小鼠体重检测结果显示, 相较于 control 组, 其他治疗组的小鼠没有出现全身性毒性反应 (图 5B)。该实验证明 PtPPy@T 能够有效递送药物 TCPP 到肿瘤部位, 且其中铂纳米簇介导的类过氧化氢酶活性有效缓解肿瘤乏氧, 并增强 PDT 疗效。

结论

癌症是当今人类面临的重大挑战之一, 本课题使用六氯铂酸作为氧化剂引发吡咯/氨基吡咯的氧化聚合, 加入硼氢化钠使得纳米粒子中的铂酸阴离子还原为铂纳米簇, 最后通过化学键和反应偶连光敏剂 TCPP, 获得由铂纳米簇掺杂的聚吡咯纳米粒子 (PtPPy@T), 用以类酶催化疗法与光动力疗法的联合抗肿瘤治疗。结果表明 PtPPy@T 纳米粒子的粒径为 91.93 ± 13.45 nm, 可以在肿瘤部位通过 EPR 效应来增强被动靶向的效果, 从而使得 PtPPy@T 纳米粒子在肿瘤部位聚积。进而使用紫外与红外光谱确定了 PtPPy@T 的成功合成; 证明了 PtPPy@T 纳米粒子在体

外具有较强的产氧和产单线态氧能力; 随后考察其细胞毒性, 结果显示在没有激光照射时, 即使在较高质量浓度下对细胞的毒性依然可以忽略不计, 说明了其具有较好的生物相容性; 在给予激光照射时, 表现出较高的细胞毒性, 证实对于肿瘤细胞的强效杀伤作用; 对其在细胞内的产氧能力进行验证, 结果发现 PtPPy@T 在细胞内具有较好的生成 O_2 的能力; 进一步证实其在细胞内较高的 $^1\text{O}_2$ 生成能力, 这些性能表明纳米粒子可以在肿瘤细胞内引起氧化损伤。最后通过建立 4T1 小鼠荷瘤模型, 验证了其在体内较好的抑瘤效果, 说明在动物体内 PtPPy 纳米载体也能够极大地促进光敏剂 TCPP 的治疗效果。这些实验证实 PtPPy 纳米载体中的铂纳米簇能够利用类过氧化氢酶活性与 H_2O_2 发生反应生成 O_2 , 解决了肿瘤部位的乏氧问题, 同时为 TCPP 发挥作用提供了充足的 O_2 , 促进光动力疗法的治疗效果。总的来说, PtPPy@T 纳米粒子是一种具有良好生物相容性的抗肿瘤纳米药物, 能够显著增强光敏剂的治疗效果, 为临床上光敏剂的递送和光动力治疗提供了新的方案和思路。

作者贡献: 张越完成了文献调研、实验方法建立、结果处理及论文初稿的撰写; 李晗玥负责部分体外抗肿瘤活性考察; 曾伟健负责颗粒制备与表征及结果处理; 梅林和陈大全负责课题的总体进展、论文的润色并提供实验经费支持。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Anand U, Dey A, Chandel AKS, et al. Cancer chemotherapy and beyond: current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics [J]. *Genes Dis*, 2023, 10: 1367-1401.
- [2] Wang W, Hao YH, Liu YS, et al. Nanomedicine in lung cancer: current states of overcoming drug resistance and improving cancer immunotherapy [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed*

- Nanobiotechnol, 2021, 13: e1654.
- [3] Estrela JM, Ortega A, Mena S, et al. Glutathione in metastases: from mechanisms to clinical applications [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2016, 53: 253-267.
- [4] Lan MH, Zhao SJ, Liu WM, et al. Photosensitizers for photodynamic therapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8: 1900132.
- [5] Tian J, Huang BX, Cui ZP, et al. Mitochondria-targeting and ROS-sensitive smart nanoscale supramolecular organic framework for combinational amplified photodynamic therapy and chemotherapy [J]. *Acta Biomater*, 2021, 130: 447-459.
- [6] Wan YL, Fu LH, Li CY, et al. Conquering the hypoxia limitation for photodynamic therapy [J]. *Adv Mater*, 2021, 33: 2103978.
- [7] Li GZ, Yuan SM, Deng DS, et al. Fluorinated polyethylenimine to enable transmucosal delivery of photosensitizer - conjugated catalase for photodynamic therapy of orthotopic bladder tumors postintravesical instillation [J]. *Adv Funct Mater*, 2019, 29: 1901932.
- [8] Liu XM, Zhou YL, Xie WW, et al. Construction of smart manganese dioxide-based all-in-one nanoplatform for cancer diagnosis and therapy [J]. *Small Methods*, 2020, 4: 2000566.
- [9] Yang YD, Yang TX, Chen FF, et al. Degradable magnetic nanoplatform with hydroxide ions triggered photoacoustic, MR imaging, and photothermal conversion for precise cancer theranostic [J]. *Nano Lett*, 2022, 22: 3228-3235.
- [10] Zhang CY, Zhang N, Niu WC, et al. Ultrasmall platinum nanoclusters: a potent chemotherapeutic drug for cancer-specific DNA damage with optimizing therapeutic efficacy while minimizing systemic toxicity [J]. *Nano Today*, 2024, 55: 102195.
- [11] Guo BL, Ma PX. Conducting polymers for tissue engineering [J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19: 1764-1782.
- [12] Miar S, Ong JL, Bizios R, et al. Electrically stimulated tunable drug delivery from polypyrrole-coated polyvinylidene fluoride [J]. *Front Chem*, 2021, 9: 599631.
- [13] Zeng WW, Wu XX, Chen T, et al. Renal-clearable ultrasmall polypyrrole nanoparticles with size-regulated property for second near-infrared light-mediated photothermal therapy [J]. *Adv Funct Mater*, 2021, 31: 2008362.
- [14] Wen KK, Wu LF, Wu XX, et al. Precisely tuning photothermal and photodynamic effects of polymeric nanoparticles by controlled copolymerization [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 12756-12761.
- [15] Biehler E, Quach Q, Abdel-Fattah TM. Synthesis of platinum nanoparticles supported on fused nanosized carbon spheres derived from sustainable source for application in a hydrogen generation reaction [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2023, 13: 1994.
- [16] Chang X, Batchelor-McAuley C, Compton RG. Hydrogen peroxide reduction on single platinum nanoparticles [J]. *Chem Sci*, 2020, 11: 4416-4421.
- [17] Chen XJ, Niu TY, Gao YZ, et al. Tunable synthesis of pH-responsive biodegradable ZnO nanospheres assembled from ultrasmall particles for cancer chemotherapy [J]. *Chem Eng J*, 2019, 371: 443-451.