

近红外二区荧光/光声双模态成像脂质体的制备与表征

刘洋¹, 王紫安¹, 蒋逸飞¹, 吉民^{1*}, 王鹏^{2**}¹东南大学生物科学与医学工程学院, 南京 210096; ²中国药科大学工学院, 南京 211198)

摘要 近红外二区(NIR-II)荧光染料 IR-1061 水溶性差、量子产率低, 限制其在生物医学方面的应用。本研究将脂质体作为载体材料, 增加其水溶性, 并且将近红外一区(NIR-I)荧光染料 IR-780 同时负载于脂质体, 以增强 IR-1061 在 NIR-II 的荧光强度。结果表明, 980 nm 激光照射下, 脂质体表现出显著增强的特征荧光。此外, 对脂质体粒径、外观、光热转换效率、光声性能以及细胞毒性进行考察。结果显示, 本研究所制备的复合物脂质体可作为 NIR-II 荧光/光声双模态成像体系, 具有用于诊断和引导肿瘤光热治疗的潜力。

关键词 荧光; 增强; 光声; 肿瘤; 光热治疗

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2019)05-0560-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190508

引用本文 刘洋, 王紫安, 蒋逸飞, 等. 近红外二区荧光/光声双模态成像脂质体的制备与表征[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(5): 560–564.

Cite this article as: LIU Yang, WANG Zian, JIANG Yifei, et al. Preparation and characterization of the second near-infrared window fluorescent/photoacoustic imaging liposomes[J]. J China Pharm Univ, 2019, 50(5): 560–564.

Preparation and characterization of the second near-infrared window fluorescent/photoacoustic imaging liposomes

LIU Yang¹, WANG Zian¹, JIANG Yifei¹, JI Min^{1*}, WANG Peng^{2**}¹School of Biological Science & Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096;²School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing, 211198, China

Abstract The second near-infrared window (NIR-II) fluorescent dye IR-1061 has the disadvantage of poor water solubility and low quantum yield, which limits its application in biomedicine. We used liposomes as the carrier to increase their water solubility, and co-loaded a near-infrared region (NIR-I) fluorescent dye IR-780 into liposomes to enhance the fluorescence intensity of IR-1061 in NIR-II. Results showed that the liposomes exhibited significantly enhanced characteristic fluorescence under 980 nm laser irradiation. In addition, particle size, appearance, photothermal conversion efficiency, photoacoustic performance and cytotoxicity of liposomes were examined. This study showed that these combined liposomes exhibited potential as a NIR-II fluorescence/photoacoustic bimodal imaging system for the diagnosis and guidance of tumor photothermal therapy.

Key words fluorescence; enhancement; photoacoustic; tumor; photothermal therapy

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81671745)

目前,恶性肿瘤已超过心血管疾病成为威胁人类健康的头号杀手。若在肿瘤早期进行诊断和治疗将会极大降低肿瘤病死率。而肿瘤的诊疗主要依赖于现代医学成像技术和肿瘤治疗技术的联合

应用^[1-2]。

近红外(NIR)荧光成像是一种新兴的非侵入性生物医学成像模式^[3],与其他几种成像模式,包括磁共振成像(MRI)、X射线、计算机

收稿日期 2019-03-12 通信作者 * Tel:13913890363 E-mail:101010516@seu.edu.cn

** Tel:13851692875 E-mail:wangpeng159@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81671745)

断层扫描(CT)、正电子发射断层扫描(PET)、超声波检查(US)等相比,具有敏感性高、成本低、可实时获取信息的优点,在肿瘤诊断和治疗应用中具有巨大潜力^[3-6]。尤其是在近红外二区(NIR-II, 1 000 ~ 1 700 nm)波长范围内组织和血液对光的吸收和散射显著降低,并且几乎无生物体自发荧光干扰,使得近红外二区荧光探针具有更深的组织穿透力和空间分辨率^[7-9]。到目前为止,发射光谱在近红外二区的材料主要包括无机材料(纳米管^[9]、量子点^[10]、稀土纳米粒子^[11-13])和有机材料(聚合物^[14-15]、有机小分子染料^[8,16])。考虑到 NIR-II 成像剂的临床转化,具有低毒性,快速代谢性质的有机小分子荧光探针仍是最理想和最佳的候选者。但多数 NIR-II 有机小分子荧光团存在水溶性差、光稳定性低、量子产率低等缺点。

最近研究发现 NIR-I 荧光染料 ICG 在 NIR-II 窗口有明显的荧光发射^[17-19]。基于此研究,本文设计并制备了一种同时负载 NIR-II 有机小分子荧光染料 IR-1061 和 NIR-I 荧光染料 IR-780 的脂质体,不仅可以增强荧光染料的生物相容性,而且可实现探针在 NIR-II 窗口的荧光信号增强和荧光/光声双模态引导的肿瘤热疗。

1 材 料

1.1 试 剂

实验所用试剂均为市售化学纯或分析纯,除特别说明外,不经处理直接使用。

大豆磷脂(Lipoid S 100,德国 Lipoid 公司);胆固醇(日本化成工业株式会社);吐温-80(上海安耐吉化学公司);其他试剂均为国产分析纯;IR-1061、IR-780(图 1)均为本实验室合成。

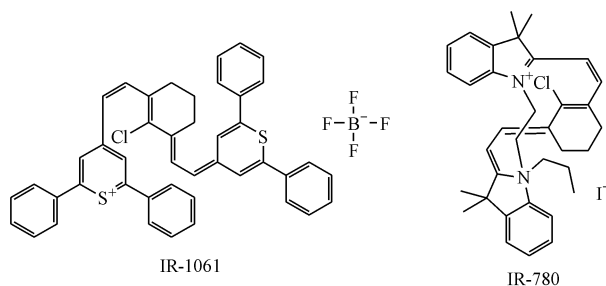


Figure 1 Structure of IR-1061 and IR-780

1.2 仪 器

旋转蒸发仪(南京科尔仪器设备有限公司);SCIENTZ-II D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物

科技股份有限公司);UV-1700 紫外分光光度计(日本岛津公司);粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司);超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);透射电子显微镜(日本电子株式会社);低温时间分辨荧光光谱仪(英国爱丁堡仪器公司);NIR II 活体成像系统(武汉光映美科技有限公司);热像仪(美国 FLIR 公司)。

1.3 细胞株

人乳腺癌细胞系(MDA-MB-231)购于美国标准生物品收藏中心(ATCC)。

2 方 法

2.1 IR-1061 和 IR-780 共载脂质体(IR-1061-780 Lip)的制备

采用薄膜水化法制备复合 IR-1061-780 Lip,具体步骤为:精确称取 IR-1061 0.25 mg、IR-780 0.55 mg、磷脂 50 mg、胆固醇 12.5 mg 和吐温-80 6.25 mg,置于 150 mL 圆底烧瓶。用二氯甲烷 10 mL 进行溶解,在旋转蒸发仪上以 37 °C、60 r/min 旋转 5 min 充分混匀。之后加入二氯甲烷 10 mL 和无水乙醇 2 mL,在旋转蒸发仪上以 37 °C、100 r/min 旋转蒸发。在圆底烧瓶底部形成均匀薄膜,然后置于真空泵 6 h 以尽量除去残存的有机溶剂。加入超纯水 8 mL,将圆底烧瓶置于恒温振荡器,37 °C、140 r/min 水化 2.5 h,溶液变为半透明状,即得 IR-1061-780 Lip 混悬液。冰浴条件下超声清洗机超声 1 min,溶液分别用 0.45 μm 和 0.22 μm 微孔滤膜连续过滤 3 次,再经透析法纯化得到 IR-1061-780 Lip。置于西林瓶中,4 °C 冰箱中保存。

2.2 IR-1061-780 Lip 的表征

取适量 IR-1061-780 Lip 溶液置于石英样品池中,使用粒径仪测定粒径;稀释 IR-1061-780 Lip 溶液至磷脂质量浓度为 0.05 mg/mL,滴至铜网,磷钨酸染色,使用透射电子显微镜观察形态;取适量 IR-1061-780 Lip 溶液置于石英样品池中,在 UV-1700 紫外分光光度计上测吸收光谱。

2.3 近红外二区荧光性质

2.3.1 IR-780 对 IR-1061 的荧光增强 取 IR-1061-780 Lip 水溶液 1 mL,同等浓度 IR-1061 的 DMSO 溶液和 IR-780 的 DMSO 溶液分别置于 3 个离心管。设置激发波长为 980 nm,测得 3 组样品

的荧光强度。

2.3.2 IR-1061-780 Lip 荧光强度与浓度的关系

取质量浓度为 0.167、0.333、0.499、0.667、0.833 mg/mL 的 IR-1061-780 Lip 1 mL 分别置于 5 个离心管。设置激发波长为 980 nm, 测得样品的荧光强度。

2.3.3 IR-1061-780 Lip 荧光光谱 Lip 取同等 IR-1061 或 IR-780 浓度的 IR-1061 脂质体 (IR-1061 Lip)、IR-780 脂质体 (IR-780 Lip) IR-1061-780 Lip 水溶液 1 mL, 利用在荧光分光光度计, 测试样品在 1 000 ~ 1 180 nm 的荧光光谱。激发波长设置为 980 nm。

2.4 IR-1061-780 Lip 的光声性质

IR-1061-780 Lip 的光声性质是通过南京大学自制的光声成像系统测定得出的。首先将 IR-1061-780 Lip 配制成不同的质量浓度 (1、2、3、4 mg/mL), 取 1 mL 于离心管, 将换能器置于离心管中, 使得样品刚好没过换能器探测头。随后将 560 nm 设置为激发波长, 测量得到不同浓度的光声信号。

2.5 IR-1061-780 Lip 光热性质

将 IR-1061-780 Lip 进行稀释, 配制质量浓度为 0.1、0.4、0.6 和 1 mg/mL 的溶液, 用 0.5 mL 的离心管装载, 用 650 nm 激光器持续照射 (1 W/cm², 2 min), 红外热像仪记录温度变化。

2.6 细胞实验

2.6.1 细胞毒性实验 取处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞用胰蛋白酶消化制成单细胞悬液, 以每孔 1×10^4 个细胞铺于 96 孔板中, 培养过夜使细胞贴壁。将质量浓度为 5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 mg/mL 的 IR-1061-780 Lip 与细胞共培养 24 h, 加入 MTT 与细胞共孵育 3 h。通过酶标仪测定紫外吸收度 ($\lambda_{\max} = 450$ nm), 计算细胞活力。每个浓度设置 5 组平行对照。

2.6.2 细胞热疗实验 取处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞用胰蛋白酶消化制成单细胞悬液, 以每孔 1×10^4 个细胞铺于 96 孔板中, 培养过夜使细胞贴壁。将质量浓度为 5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 mg/mL 的 IR-1061-780 Lip 与细胞共培养 2 h, 用 650 nm 激光器持续照射 (1 W/cm², 2 min) 后继续培养至 24 h, 加入 MTT 与细胞共孵育 3 h。通过酶标仪紫外吸收度 ($\lambda_{\max} = 450$ nm),

计算细胞活力。

3 结果与讨论

3.1 IR-1061-780 Lip 表征

透射电子显微镜结果 (图 2) 显示, 制备的 IR-1061-780 Lip 呈大小均匀、形貌规则的球形。DLS 检测 IR-1061-780 Lip 平均粒径约为 150 nm, PDI 为 0.16, 进一步表明 IR-1061-780 脂质体大小均一。紫外/可见/近红外光谱 (图 3) 结果显示, IR-1061-780 Lip 在 790 和 1 050 nm 处有吸收峰, 证明了 IR-780 和 IR-1061 的载入。

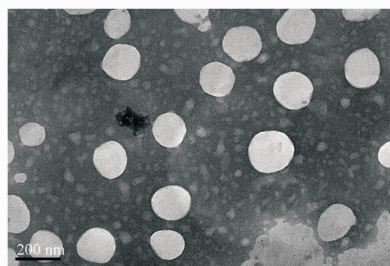


Figure 2 TEM images of IR-1061-780 liposome (IR-1061-780 Lip)

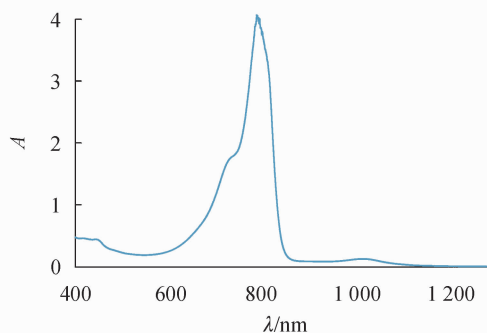


Figure 3 UV/Vis/NIR absorption spectra (500-1 300 nm) of IR-1061-780 Lip in water

3.2 近红外二区荧光性质

980 nm 激光照射下的样品荧光强度由图 4-A 所示, 相较于游离的 IR-1061, IR-1061-780 Lip 的荧光明显增强约 10 倍左右。而之前的研究中^[18], DMSO 溶液中游离的 IR-1061 的荧光强度远远大于 IR-1061 在水溶液中的荧光强度。因此, 本研究制备的脂质体中 IR-780 确实增强了 IR-1061 在近红外二区的荧光强度。本研究选择激发波长为 980 nm, 在此波长处 IR-780 只有微弱的荧光发射, 因此猜想可能不是单纯的能量转移或协同作用。IR-780 和 IR-1061 均为疏水性小分子, 存在于脂质体中的疏水区域, 或许二者发生分子间相互作用影响了荧光性能。图 4-B 显示, IR-1061-780 Lip 荧光

强度随脂质体浓度增强而增强,表明二者呈正相关,进一步说明制备的 IR-1061-780 Lip 具有良好的荧光性能。为了排除脂质体的包裹对 IR-1061 荧光强度的影响,本研究测试了同等 IR-1061 或 IR-780 浓度的 IR-1061 Lip、IR-780 Lip 和 IR-1061-

780 Lip 的荧光光谱。结果如图 4-C 所示,同时载有 IR-1061 和 IR-780 的脂质体相较于 IR-1061 Lip、IR-780 Lip 的荧光强度明显增强,表明 IR-780 确实增强了 IR-1061 的荧光强度。

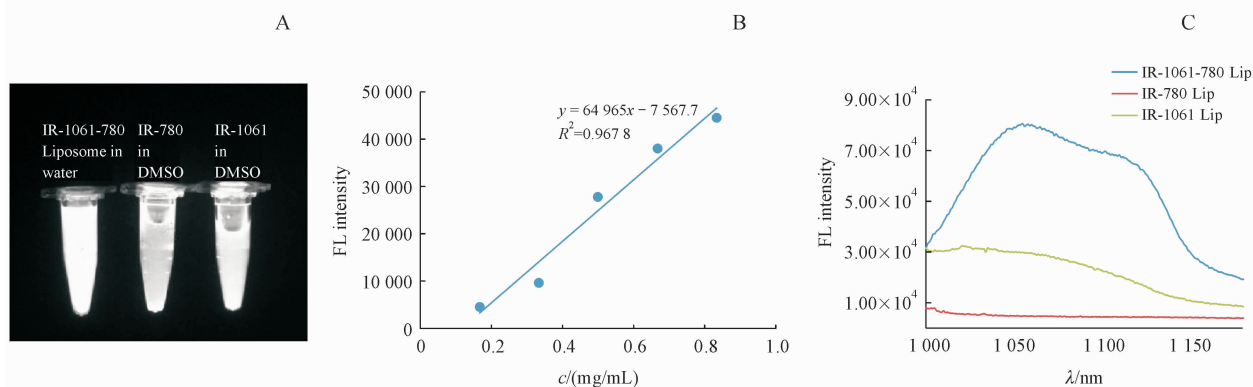


Figure 4 (A) NIR-II fluorescence images of IR-1061-780 liposome in water, free IR-780 and IR-1061 in DMSO; (B) Linear fitting of Fluorescence intensity as a function of IR-1061-780 Lip concentration; (C) Fluorescence spectra of IR-1061-780 Lip, IR-780 Lip and IR-1061 Lip

3.3 光热性能检测

经过 650 nm 激光辐照后, IR-1061-780 Lip 升温显著,与脂质体的浓度呈正相关(图 5-A)。当脂质体质量浓度为 1 mg/mL 时, 1 W/cm² 激光辐照 2 min 后,从温度升高 27.1 °C,即使质量浓度只有 0.1 mg/mL,温度也升高 7.8 °C。而 2 min 内超纯水的温度只升高了 1.3 °C。说明 IR-1061-780 Lip 具有优异的光热转换能力,这对于光声成像和光热

治疗至关重要。

3.4 光声性能

本研究测试了 IR-1061-780 Lip 的光声信号与脂质体浓度之间的关系。如图 5-B 所示,在 560 nm 波长照射下, IR-1061-780 Lip 的光声信号强度随着材料浓度线性增强。这些结果表明该纳米粒子具备良好的光声成像性质。

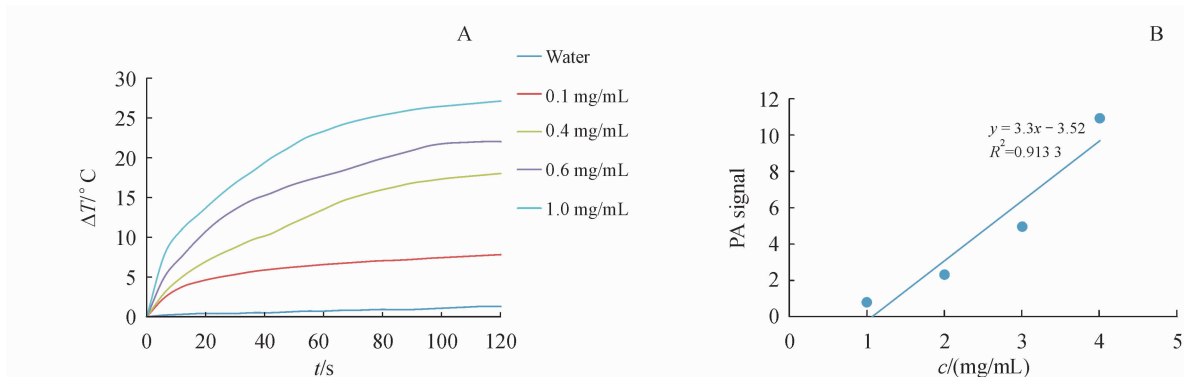


Figure 5 (A) Temperature increase of IR-1061-780 Lip under irradiation for a period of time; (B) Photoacoustic (PA) intensity of IR-1061-780 Lip with different concentration under laser irradiation

3.5 细胞实验

利用 MTT 法测试了脂质体的毒性,如图 6 所示,当不同质量浓度的 IR-1061-780 Lip 和细胞共同培养 24 h 后,细胞存活率都在 95% 以上。即使质量浓度高达 5 mg/mL,对细胞的存活率也并无显著影响,这说明 IR-1061-780 Lip 具有良好的安全

性,对 MDA-MB-231 细胞几乎没有伤害。而近红外光照之后,细胞存活率明显降低。当脂质体浓度为 5 mg/mL 时,细胞存活率降低至 47%,表明 IR-1061-780 Lip 对 MCF-7 细胞有一定的抑制率,抑制作用随着浓度的增加,说明脂质体对 MDA-MB-231 细胞抑制呈浓度依赖性。

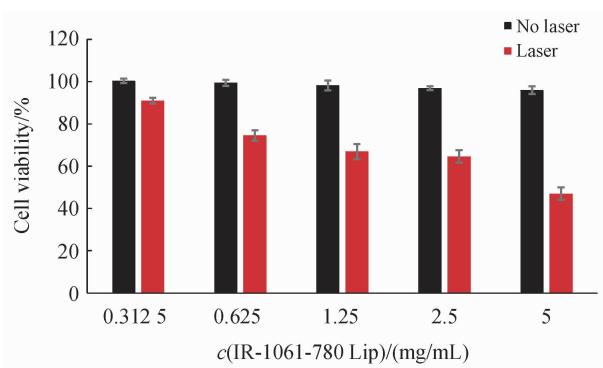


Figure 6 Cell viability of MDA-MB-231 cells treated with different concentrations of IR-1061-780 Lip with or without laser irradiation ($\bar{x} \pm s, n=5$)

4 结论

本研究通过薄膜水化法制备同时负载 NIR-I 荧光染料 IR-780 和 NIR-II 荧光染料 IR-1061 的脂质体, 荧光性能的测试结果表明 IR-780 的加入使得该脂质体具有远大于游离 IR-1061 的荧光发射。此外, 良好的光热转换效率和光声性能使得 IR-1061-780 Lip 具有 NIR-II 荧光/光声双模态成像和肿瘤热疗剂的潜力。

参考文献

- [1] Tao ZM, Hong GS, Shinji C, *et al.* Biological imaging using nanoparticles of small organic molecules with fluorescence emission at wavelengths longer than 1000 nm[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, **52**(49): 13002–13006.
- [2] Bu LH, Shen BZ, Cheng Z. Fluorescent imaging of cancerous tissues for targeted surgery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, **76**: 21–38.
- [3] Ding F, Zhan YB, Lu XJ, *et al.* Recent advances in near-infrared II fluorophores for multifunctional biomedical imaging[J]. *Chem Sci*, 2018, **9**(19): 4370–4380.
- [4] He SQ, Song J, Qu JL, *et al.* Crucial breakthrough of second near-infrared biological window fluorophores; design and synthesis toward multimodal imaging and theranostics[J]. *Chem Soc Rev*, 2018, **47**(12): 4258–4278.
- [5] Hong GS, Antaris AL, Dai HJ. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging[J]. *Nat Biomed Eng*, 2017, **1**: 0010.
- [6] Yan DH, Wang B. Synthesis and characterization of $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ magnetic-fluorescent bifunctional nanoparticles[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2012, **43**(4): 307–311.
- [7] Dang XN, Gu L, Qi JF, *et al.* Layer-by-layer assembled fluorescent probes in the second near-infrared window for systemic delivery and detection of ovarian cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, **113**(19): 5179–5184.
- [8] Zhang XD, Wang HS, Antaris AL, *et al.* Traumatic brain injury imaging in the second near-infrared window with a molecular fluorophore[J]. *Adv Mater Weinheim*, 2016, **28**(32): 6872–6879.
- [9] Diao S, Hong GS, Antaris AL, *et al.* Biological imaging without autofluorescence in the second near-infrared region[J]. *Nano Res*, 2015, **8**(9): 3027–3034.
- [10] Yu XJ, Yang K, Chen XY, *et al.* Black hollow silicon oxide nanoparticles as highly efficient photothermal agents in the second near-infrared window for *in vivo* cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2017, **143**: 120–129.
- [11] Ma JJ, Yu MX, Zhang Z, *et al.* Gd-DTPA-coupled Ag_2Se quantum dots for dual-modality magnetic resonance imaging and fluorescence imaging in the second near-infrared window[J]. *Nanoscale*, 2018, **10**(22): 10699–10704.
- [12] Yang DP, Cao C, Feng W, *et al.* Synthesis of $\text{NaYF}_4: \text{Nd} @ \text{NaLuF}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PS}$ colloids for fluorescence imaging in the second biological window[J]. *J Rare Earths*(中国稀土学报: 英文版), 2018, **36**(2): 113–118.
- [13] Li YB, Li XL, Xue ZL, *et al.* Second near-infrared emissive lanthanide complex for fast renal-clearable *in vivo* optical bioimaging and tiny tumor detection[J]. *Biomaterials*, 2018, **169**: 35–44.
- [14] Feng Y, Zhu SJ, Antaris AL, *et al.* Live imaging of follicle stimulating hormone receptors in gonads and bones using near infrared II fluorophore[J]. *Chem Sci*, 2017, **8**(5): 3703–3711.
- [15] Hong GS, Zou YP, Antaris AL, *et al.* Ultrafast fluorescence imaging *in vivo* with conjugated polymer fluorophores in the second near-infrared window[J]. *Nat Commun*, 2014, **5**: 4206.
- [16] Wan H, Ma HL, Zhu SJ, *et al.* Developing a bright NIR-II fluorophore with fast renal excretion and its application in molecular imaging of immune checkpoint PD-L1[J]. *Adv Funct Mater*, 2018, **28**(50): 1804956.
- [17] Zeh R, Sheikh S, Xia LL, *et al.* The second window ICG technique demonstrates a broad plateau period for near infrared fluorescence tumor contrast in glioblastoma[J]. *PLoS One*, 2017, **12**(7): e0182034. doi:10.1371/journal.pone.0182034.
- [18] Starosolski Z, Bhavane R, Ghaghada KB, *et al.* Indocyanine green fluorescence in second near-infrared (NIR-II) window[J]. *PLoS One*, 2017, **12**(11): e0187563.
- [19] Tao ZM, Hong GS, Shinji C, *et al.* Biological imaging using nanoparticles of small organic molecules with fluorescence emission at wavelengths longer than 1000 nm[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, **52**(49): 13002–13006.