

基于透明质酸的靶向纳米探针的构建及体外抗肿瘤活性

戚筱羽¹, 叶雨霏¹, 陈雪梅², 朱晓南¹, 张雨婷¹, 尹 健^{1*}, 王晓丽^{1**}, 周楠迪^{1***}¹江南大学生物工程学院糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122;²江南大学食品学院国家保健食品工程研究中心, 无锡 214122)

摘要 以透明质酸(hyaluronic acid, HA)为药物递送载体,依次连接阿霉素(doxorubicin, DOX)、天然吡咯花青素染料IR808和过氧化氢酶(catalase, CAT),最后通过自组装得到具有抗肿瘤和荧光成像作用的纳米探针CAT@HA-DOX-IR808 NPs。利用紫外可见分光光度计、荧光分光光度计以及透射电子显微镜等对其进行表征,然后在溶液和细胞水平开展其荧光成像和抗肿瘤活性研究。实验结果表明:构建的纳米探针CAT@HA-DOX-IR808为均匀的近球形,尺寸约为75 nm。在pH 5.0和透明质酸酶环境中,DOX在前10 h的释放率达到80%以上。激光共聚焦结果显示,在CD44阳性细胞中,该纳米探针组展现出比游离药物组以及阴性细胞组更显著的荧光信号。细胞毒实验中,在CAT@HA-DOX-IR808 NPs + NIR组,只有大约40%的MDA-MB-231细胞在最高浓度的CAT@HA-DOX-IR808 NPs下存活。因此,纳米探针CAT@HA-DOX-IR808具有显著增强的抗肿瘤功效,在乳腺癌的体外成像和治疗中具有广阔的应用前景。

关键词 透明质酸;阿霉素;IR808;纳米探针;乳腺癌;近红外成像;化疗-光动力协同治疗

中图分类号 R945 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2022)05-0542-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220505

引用本文 戚筱羽,叶雨霏,陈雪梅,等.基于透明质酸的靶向纳米探针的构建及体外抗肿瘤活性[J].中国药科大学学报,2022,53(5): 542-553.

Cite this article as: QI Xiaoyu, YE Yufei, CHEN Xuemei, *et al.* Construction of targeted nanoprobe based on hyaluronic acid and its anti-tumor activity *in vitro* [J]. *J China Pharm Univ*, 2022, 53(5): 542 - 553.

Construction of targeted nanoprobe based on hyaluronic acid and its anti-tumor activity *in vitro*QI Xiaoyu¹, YE Yufei¹, CHEN Xuemei², ZHU Xiaonan¹, ZHANG Yuting¹, YIN Jian^{1*}, WANG Xiaoli^{1**}, ZHOU Nandi^{1***}

¹The Ministry of Education Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122; ²National Engineering Research Center for Function Food, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract Hyaluronic acid (HA) was used as drug delivery carrier, and the doxorubicin (DOX), IR808 and catalase (CAT) were modified on hyaluronic acid (HA) to form the nano-probe CAT@HA-DOX-IR808 NPs with anti-tumor and fluorescence imaging by self-assembly. It was characterized by UV-Vis spectrophotometer, fluorescence spectrophotometer and transmission electron microscope, and its fluorescence imaging and antitumor activity were studied at solution and cell level. The experimental results showed that CAT@HA-DOX-IR808 NPs displayed a uniform near-spherical morphology with a size of 75 nm approximately. Under the condition of pH 5.0 + hyaluronidase (HAase), the release rate of DOX reached more than 80% in the first 10 hours. In the CD44 positive cells, laser confocal imaging results showed that the group of CAT@HA-DOX-IR808 NPs had more significant fluorescence signals than the group of free drugs and negative cell. In the cytotoxicity

收稿日期 2022-04-27 **通信作者** *Tel: 0510-85328229 E-mail: jianyin@jiangnan.edu.cn

**Tel: 0510-85197089 E-mail: xiaoliwang@jiangnan.edu.cn

***Tel: 0510-85197831 E-mail: zhounandi@jiangnan.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 21877054)

test, only about 40% of the MDA-MB-231 cells survived at the highest concentration of CAT@HA-DOX-IR808 NPs of the group of CAT@HA-DOX-IR808 NPs + NIR. Therefore, CAT@HA-DOX-IR808 NPs possess significantly enhanced anti-tumor effect with broad application prospect in the imaging and treatment of breast cancer *in vitro*.

Key words hyaluronic acid; doxorubicin; IR808; nanoprobe; breast cancer; near infrared imaging; chemotherapy-photodynamic synergistic therapy

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21877054)

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,严重地危害女性健康^[1]。在全球范围内,每年有超过 1 000 万人被新确诊为癌症。目前治疗乳腺癌最常见的方法包括手术切除、放疗、化疗以及联合治疗等^[2],但治疗过程中都存在一定的局限性,如手术切除不彻底、放疗缺乏选择性、化疗具有极强不良反应等^[3]。因此,迫切需要开发新型有效的方法用于治疗乳腺癌^[1, 4]。

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是一种天然的酸性糖胺聚糖,由二糖的重复单元 *N*-乙酰葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸交替组成,是细胞外基质的主要成分^[5],主要存在于关节滑膜流体和细胞外基质中^[6]。研究表明,HA 能与多种蛋白受体(如 CD44 受体)作用,参与细胞信号传导^[7]。随着纳米技术的快速发展,HA 与其受体之间的相互作用也被广泛用于药物的递送,从而增强对肿瘤细胞的生物相容性和靶向性^[8]。此外,由于肿瘤环境中透明质酸酶(HAase)的存在,以 HA 为基础形成的纳米材料可以有效实现药物的可控释放。

阿霉素(doxorubicin, DOX)是一种非常有效的化疗药物,通过抑制拓扑异构酶活性而导致 DNA 损伤和细胞周期停滞^[9]。随着 DOX 的广泛使用,其存在的耐药性、心脏毒性和缺乏靶向性等不良反应逐渐显现^[10]。研究表明,负载在纳米材料中的 DOX 靶向后释放治疗效果更好^[11]。光动力治疗是一种新型的肿瘤治疗手段,主要依靠光敏剂、光和氧气产生光动力效应^[12]。在近红外(near infrared, NIR)光照射后,光敏剂可以将内源性分子氧转化为具有细胞毒性的活性氧,从而抑制肿瘤生长^[13]。氧气的存在有利于光动力治疗发挥更大的作用^[14]。近年来,各种类型的 NIR 光敏剂相继出现,如卟啉、花青素和二吡咯亚硼等^[15-16]。其中,IR808 是一种天然吡咯花青染料,具

有良好的光稳定性、较强的水溶性和较高的荧光强度,因此被认为是一种良好的 NIR 光敏剂。IR808 可以同时用于细胞内荧光成像和肿瘤治疗^[17-18]。有研究表明,化疗-光动力治疗的协同疗法可以显著提高肿瘤的疗效,并可降低化疗药物的不良反应^[19]。

基于此,本研究以 HA 为药物递送载体,依次连接 DOX、IR808 和过氧化氢酶(catalase, CAT),然后通过自组装构建了一种基于 HA 的多功能纳米探针 CAT@HA-DOX-IR808 NPs,该纳米探针具有靶向递送、荧光成像以及体外化疗-光动力联合治疗的特性。如图 1-A 所示,选择己二酸二酰肼(ADH)作为 HA 与 DOX 之间的连接臂。首先,HA 的羧基和 ADH 的肼基通过酰胺反应得到 HA-ADH,在此基础上,ADH 另一端的肼基可与 DOX 上的酮羰基反应,通过形成酰肼键得到 HA-DOX 复合物。酰肼键在酸性条件下较敏感易断裂,从而可以释放出 DOX。IR808 的羧基可与 HA-DOX 聚合物上剩余未反应的 ADH 上的肼基发生酰胺反应形成 HA-DOX-IR808 聚合物。最后,HA-DOX-IR808 聚合物与 CAT 通过共价连接并自组装得到纳米探针 CAT@HA-DOX-IR808 NPs。纳米探针的作用原理如图 1-B 所示,CAT@HA-DOX-IR808 NPs 可通过 HA 靶向 CD44 从而进入乳腺癌细胞,进入细胞后,在肿瘤细胞酸性微环境中,纳米探针中酸敏感的酰肼键断裂,释放出 DOX 发挥化疗作用。在 NIR 光照射下,纳米探针中的 IR808 一方面可以实现细胞内 NIR 荧光成像,另一方面可以发挥光动力治疗作用。

1 材料

1.1 药品与试剂

透明质酸(HA,相对分子质量 3 kD ~ 8 kD,山

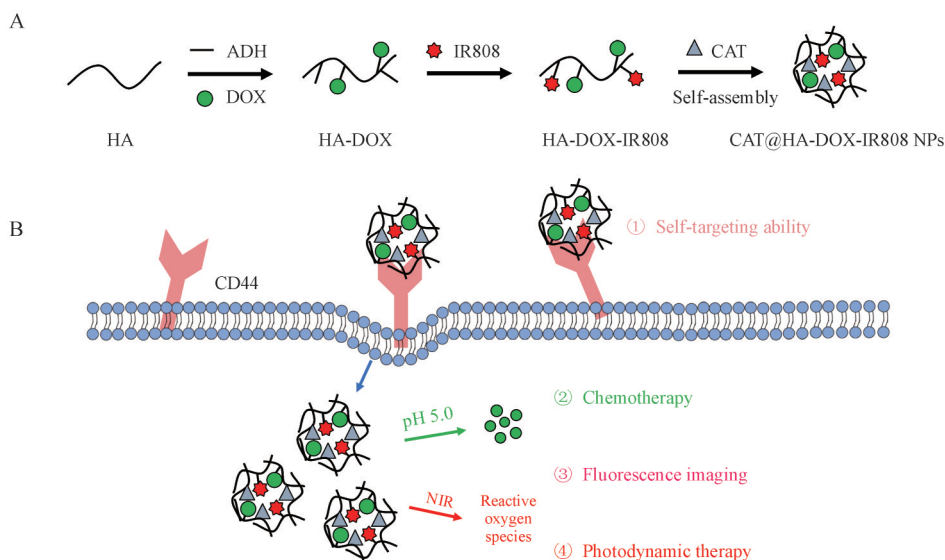


Figure 1 Schematic illustration of (A) the preparation of CAT@HA-DOX-IR808 NPs and (B) therapeutic process of CAT@HA-DOX-IR808 NPs in tumor cells

ADH: Adipic dihydrazide; HA: Hyaluronic acid; DOX: Doxorubicin; CAT: Catalase; NP: Nanoparticle; NIR: Near infrared

东福瑞达生物医药有限公司);阿霉素(DOX)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、*N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)和1-羟基苯并三唑(HOBT)(上海阿达玛斯试剂有限公司);过氧化氢酶(CAT)、己二酸二酰肼(ADH)、BCA试剂盒、9,10-蒽基-双(亚甲基)二丙二酸(ABDA)、蛋白酶K、钼酸铵、3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2*H*-溴代四唑(MTT)和2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)(西格玛奥德里奇贸易有限公司);DMEM培养基(赛默飞世尔科技公司);4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)和多聚甲醛(上海碧云天生物技术有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

ZEN3690激光粒度仪(英国马尔文公司);透射电子显微镜(TEM)、紫外分光光度计和荧光分光光度计(日本日立集团);激光共聚焦荧光显微镜(徕卡显微系统贸易有限公司);流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 细胞

人乳腺癌细胞MDA-MB-231和人胚肾HEK-293细胞均由江南大学生物工程学院糖化学与生物技术教育部重点实验室提供。

2 方法

2.1 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 及相关材料的制备

2.1.1 HA-DOX聚合物的合成 HA-DOX聚合物的合成路线如图2所示。首先对HA进行ADH修饰,将HA 400 mg和ADH 864 mg溶于超纯水40 mL中,室温下搅拌反应20 min。接着向该溶液中加入适量的0.1 mol/L盐酸使整个溶液pH达到4.75,然后加入EDC·HCl 570 mg,于室温搅拌反应5 h,并且维持pH为4.75。向反应液中加入适量的0.1 mol/L氢氧化钠调pH至7.0以终止反应。得到的HA-ADH聚合物溶液用25%乙醇溶液和超纯水透析(截留相对分子质量为3.5 kD)纯化2 d后,通过冷冻干燥得到HA-ADH聚合物。

将冻干后的HA-ADH聚合物85 mg溶于pH 6.5的磷酸缓冲盐溶液(PBS)30 mL中,室温搅拌下将1 mg/mL DOX溶液10 mL以滴加的方式加入上述溶液,滴加完成后在室温下避光反应24 h。反应结束后HA-DOX聚合物溶液用25%乙醇溶液和超纯水透析(截留相对分子质量为3.5 kD)纯化2 d,最后通过冷冻干燥得到HA-DOX聚合物。

2.1.2 HA-DOX-IR808聚合物的合成 HA-DOX-IR808聚合物的合成路线如图3所示。在室温条件

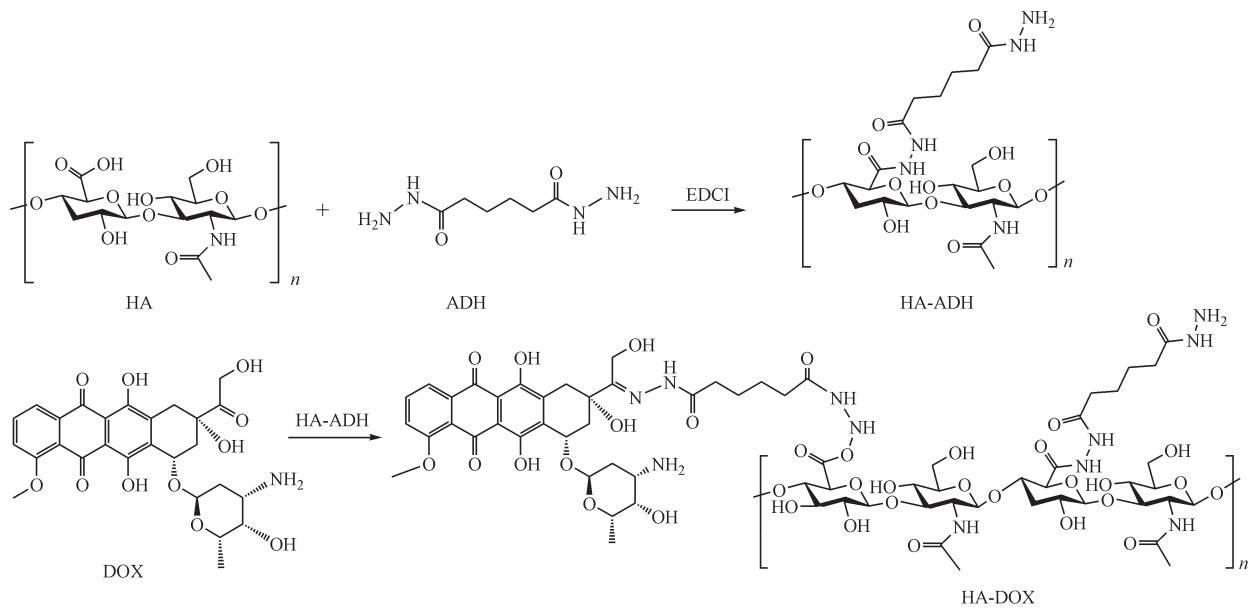


Figure 2 Synthetic route of HA-DOX polymer

下,将IR808 39.6 mg溶于DMF 4 mL溶液中,并依次加入EDC·HCl 9.6 mg和NHS 2.9 mg,避光反应4 h。然后加入含有50 mg HA-DOX聚合物的DMF-H₂O(1:1)溶液5 mL,室温下避光反应24 h,反应结

束后用25%乙醇溶液和超纯水透析(截留相对分子质量为3.5 kD)纯化2 d,最后通过冷冻干燥得到HA-DOX-IR808聚合物。

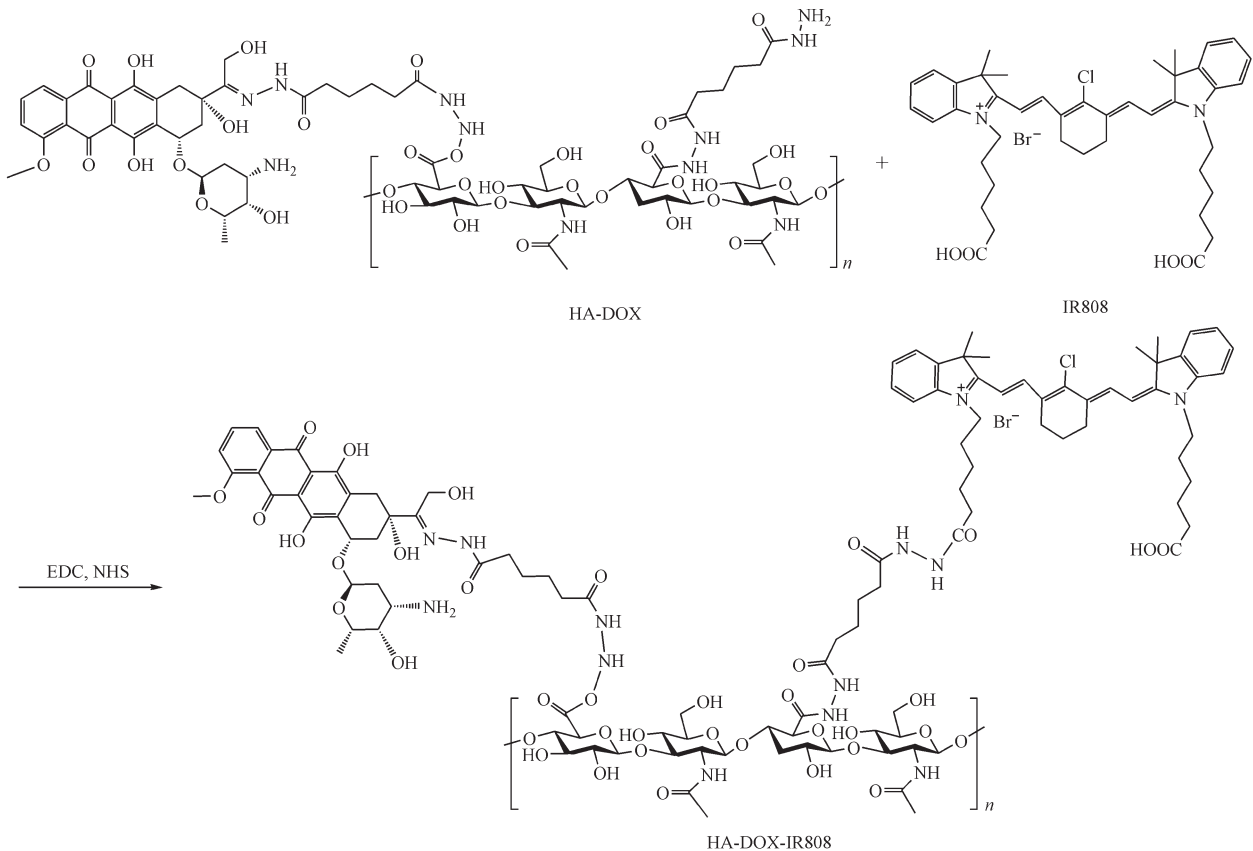


Figure 3 Synthetic route of HA-DOX-IR808 polymer

2.1.3 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 的制备 将 HA-DOX-IR808 聚合物 40 mg 溶于超纯水 30 mL 中,搅拌条件下加入 EDC·HCl 7.9 mg,室温下避光反应 0.5 h,然后加入 HOBt 2.4 mg 继续反应 0.5 h,接着加入 CAT 12 mg,于室温下避光反应 18 h。反应结束后,将 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 溶液装入超滤离心管(截留相对分子质量为 100 kD),以 5 000 r/min 离心 10 min,弃去超滤出的液体,将其重悬于超纯水中,重复上述离心步骤 3 次,获得最终的 CAT@HA-DOX-IR808 NPs。

2.1.4 其他相关纳米材料的制备 制备了 CAT@HA NPs、HA-DOX NPs 和 HA-DOX-IR808 NPs 作为之后的实验对照组。CAT@HA NPs 所需的合成方法与 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 基本相同,只是用 HA 代替 HA-DOX-IR808 聚合物制成,其余反应条件一致。HA-DOX NPs 和 HA-DOX-IR808 NPs 采用直接超声法获得。将 HA-DOX 和 HA-DOX-IR808 聚合物 5 mg 分别溶于超纯水 5 mL 中,超声 15 min 后,溶液装入超滤离心管(截留相对分子质量为 10 kD),以 5 000 r/min 离心 10 min,弃去超滤出的液体,将其重悬于超纯水中,重复上述离心步骤 3 次,获得最终的 HA-DOX NPs 和 HA-DOX-IR808 NPs。

2.2 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 及相关材料的表征

2.2.1 DOX/IR808 的测定 将 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 及相关材料用超纯水稀释后,通过紫外分光光度计和荧光分光光度计测定对应的特征峰。

2.2.2 CAT 的测定 将 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 及相关材料用超纯水稀释后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)实验。

2.2.3 平均粒径及形貌分析的测定 将 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 及相关材料用超纯水稀释后,通过激光粒度仪和 TEM 进行测定分析。

2.3 阿霉素体外释放实验

经过检测,DOX 在 486 nm 处有独特的紫外特征峰(A_{486})。根据测定 DOX 溶液在不同质量浓度(0, 0.001, 0.4, 0.8, 2, 4, 8, 10 和 20 $\mu\text{g/mL}$)时的 A_{486} ,绘制出 DOX 质量浓度与 A_{486} 的标准曲线。检测 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 溶液的 A_{486} ,带入标准曲线,即可得到 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 溶液中

DOX 的含量。根据公式(1)计算载药率(loading content, LC),公式(2)计算包封率(entrapment efficiency, EE):

$$\text{LC}(\%) = (m_a/m_0) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{EE}(\%) = (m_a/m_c) \times 100 \quad (2)$$

其中, m_a 、 m_0 、 m_c 分别代表 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 溶液中所含 DOX 的质量、整个 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 的质量、参与反应的 DOX 质量。

计算得到溶液中 DOX 的含量后,将 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 溶液进行稀释或浓缩至溶液中 DOX 质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,取出 4 mL,每毫升装入 1 个透析袋(截留相对分子质量为 10 kD),两端用线固定确保其中的液体不会溢出。将它们分别装入载有 PBS (pH 5.0)、PBS (pH 5.0) + HAase (120 unit/mL)、PBS (pH 7.4)、PBS (pH 7.4) + HAase (120 unit/mL) 19 mL 的 4 种离心管中。离心管在 37 $^{\circ}\text{C}$ 以 120 r/min 连续振荡并在固定的时间点(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24, 30, 36 和 48 h)收集 PBS 外液 1 mL,并加入上述相同参数的 PBS 作为替换。最后,检测上述收集到的溶液 A_{486} 。根据公式(3)计算 DOX 的释放率(release ratio, RR),整个实验重复 3 次进行。

$$\text{RR}(\%) = (c_n \times V_1 + \sum_{n=1}^{15} c_{n-1} \times V_2) / m \times 100 \quad (3)$$

式(3)中, c_n 代表第 n 次取出溶液时 DOX 的质量浓度(mg/mL); V_1 代表整个体系中溶液的总容积(mL); V_2 代表每次取出溶液的体积(mL); m 代表加入该体系的总 DOX 质量(mg)。

2.4 过氧化氢酶的含量和活性的测定

2.4.1 过氧化氢酶的含量测定 采用 BCA 试剂盒测定 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 中 CAT 的含量。所有步骤均按照 BCA 试剂盒说明书操作。先将试剂盒中 A 液 8 mL 和 B 液 0.16 mL 混合均匀,并将标准蛋白溶液白蛋白(BSA)稀释成 0, 100, 200, 400, 600, 800 和 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 。上述溶液准备完成后,将样品、BSA 标准品 25 μL 分别加入 96 孔板中,并且每孔继续加入 A 和 B 的混合液 200 μL ,摇晃 30 s,密封盖住后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min,冷却至室温后,用酶标仪检测上述溶液的 A_{562} 。将不同浓度的 BCA 与其相对应的 A_{562} 制成标准曲线,检测样品的 A_{562} ,带入上述标准曲线,计算 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 中 CAT 的浓度。

2.4.2 过氧化氢酶活性测定 将 CAT、CAT@HA NPs 和 CAT@HA-DOX-IR808 NPs (CAT 质量浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$) 溶液 0.2 mL 分别与蛋白酶 K (60 $\mu\text{g/mL}$) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,在预定时间点 (0, 0.5, 1, 2, 3, 4 和 5 h) 取出 0.2 mL 加入 50 mmol/L 过氧化氢 (H_2O_2) 溶液 1 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 1 min 后, 加入 32.4 mmol/L 钼酸铵溶液 1 mL 使反应终止, 用酶标仪测定上述溶液的 A_{405} 。

2.5 纳米探针的稳定性评价

将 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 溶于超纯水、0.01 mol/L PBS (pH 7.4)、DMEM 3 种溶液中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下连续避光静置孵育 5 d, 每天检测其水合粒径的大小以评价其在模拟生理环境中的稳定性。

2.6 溶血实验

用山羊红细胞进行溶血试验。将不同质量的 CAT@HA-DOX-IR808 NPs (1, 5, 10, 20 和 50 μg) 溶于 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 500 μL 中, 并加入到 24 孔板中。超纯水为阳性对照, 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 为阴性对照。所有样品中均加入山羊红细胞 500 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 2 h。孵育完成后, 将上述混合物以 1 000 r/min 离心 10 min, 结束后, 每组吸取上清液 50 μL 至 96 孔板中, 用酶标仪检测上述溶液的 A_{540} 。根据公式 (4) 计算溶血率 (hemolytic rate, HR):

$$\text{HR}(\%) = (A_1 - A_3) / (A_2 - A_3) \times 100 \quad (4)$$

式 (4) 中, A_1 、 A_2 和 A_3 分别代表样品、阳性对照组和阴性组在 540 nm 处的吸收度。

2.7 单线态氧的检测实验

首先验证了游离 IR808 产生单线态氧的能力。将不同浓度的 IR808 (0, 100, 200, 300, 400, 500, 750 和 1 000 $\mu\text{g/mL}$) 400 μL 与 1.33 g/mL ABDA 100 μL 混合后检测 0 min 时溶液的荧光强度 F_0 (激发波长为 380 nm), 然后用 808 nm 的 NIR 光 (0.5 W/cm^2) 持续照射 2 min 后重新检测溶液荧光强度 F_2 。将上述两个荧光数据相减得到的最大差值 ($F_0 - F_2$), 表示 IR808 在该浓度下产生单线态氧的效果最好。根据前期实验结果, 将 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 溶液配制为与上述相同的 IR808 浓度, 用 808 nm 激光照射后, 检测不同时间点 (0, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 和 12 min) 的溶液荧光强度。

2.8 细胞内活性氧的检测实验

将 MDA-MB-231 和 HEK-293 细胞都稀释成细胞浓度为每毫升 3.0×10^5 个细胞, 并在每个激光共聚焦培养皿中加入上述细胞培养液 1 mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下孵育 15 h。孵育结束后, 吸出培养液, 将每种类型的细胞随机分为 4 组 ($n = 6$) 进行实验: (1) IR808、(2) IR808 + NIR、(3) CAT@HA-DOX-IR808 NPs、(4) CAT@HA-DOX-IR808 NPs + NIR。在每个培养皿中加入含有 IR808 或 CAT@HA-DOX-IR808 NPs (两种溶液中 IR808 质量浓度均为 0.21 $\mu\text{g/mL}$, CAT@HA-DOX-IR808 NPs 质量浓度为 4.277 $\mu\text{g/mL}$) 的新鲜 DMEM 孵育 4 h。结束后, 吸出 DMEM, 用 PBS 洗涤 3 次, 再在每个培养皿中加入含有 20 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 的培养基 1 mL, 孵育 20 min 后使用 808 nm 的激光 (1 W/cm^2) 照射 2 min, 同时设置不进行光照的组别进行对照, 之后继续孵育 30 min, 吸取上述包含药物的培养基, 用 PBS 洗涤 3 次后, 加入 4% 多聚甲醛固定, 加入 0.5 mL DAPI 进行细胞核染色。通过激光共聚焦荧光显微镜记录细胞内新生成的 2', 7'-二氯荧光素 (DCF) 的荧光强度 (激发波长为 502 nm, 发射波长为 520 ~ 540 nm), 以考察细胞内活性氧的生成情况。

2.9 细胞摄取和细胞内成像实验

将 MDA-MB-231 和 HEK-293 细胞在共聚焦激光培养皿 (用于激光共聚焦荧光显微镜成像) 或 12 孔板 (用于流式细胞仪检测 DOX 荧光) 中以每个培养皿或孔的密度为每毫升 3.0×10^5 个细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下培养 15 h。取出培养液, 用 PBS 洗涤 3 次。将含有 DOX、IR808、CAT@HA-DOX-IR808 NPs + HA 和 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 的新鲜培养基加入激光共聚焦培养皿或 12 孔板中孵育 4 h, 其中 CAT@HA-DOX-IR808 NPs + HA 组先将 HA 与细胞共孵育 1 h, 样品中 DOX、IR808 和 HA 的质量浓度分别为 0.42, 0.21 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 。激光共聚焦培养皿和 12 孔板在以上的操作步骤中保持一致。接着, 在激光共聚焦培养皿的处理中, 将包含药物的 DMEM 吸出后, PBS 洗涤 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定, 15 min 后吸出多聚甲醛, PBS 清洗 3 次后加入 DAPI 0.5 mL 对细胞核进行染色。用激光共聚焦荧光显微镜 (63 倍油镜) 拍摄细胞在不同通道上的荧光情况。在 12 孔板的细胞处理中, 将包含

药物的DMEM吸出后, PBS洗涤3次, 使用胰蛋白酶消化后进行离心操作, 吸去上清液, 将细胞重新溶解于0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中, 在流式细胞仪中测定DOX的荧光强度。

2.10 体外抗肿瘤活性研究

将MDA-MB-231和HEK-293细胞培养液200 μ L(每毫升 1×10^4 个细胞)接种于96孔板中孵育15 h。反应结束后, 吸出培养基, 用PBS洗涤3次。每6个小孔为一组, 分为DOX、IR808(+ NIR, 0.5 W/cm²)、CAT@HA-DOX-IR808 NPs和CAT@HA-DOX-IR808 NPs(+ NIR, 0.5 W/cm²)4组。不加任何样品的DMEM组为阳性对照组。每孔加入含有DOX、IR808、CAT@HA-DOX-IR808 NPs的DMEM 200 μ L, 设计了8个不同的CAT@HA-DOX-IR808 NPs浓度梯度, 包括0.102, 1.018, 5.092, 10.183, 20.367, 40.733, 81.466和101.833 μ g/mL。其中每组对应DOX浓度为 1.8×10^{-5} , 1.8×10^{-4} , 9.2×10^{-4} , 1.8×10^{-3} , 3.6×10^{-3} , 7.3×10^{-3} , 1.5×10^{-2} 和 1.8×10^{-2} μ mol/L, IR808浓度为 6.5×10^{-6} , 6.5×10^{-5} , 3.3×10^{-4} , 6.5×10^{-4} , 1.3×10^{-3} , 2.6×10^{-3} , 5.0×10^{-3} 和 6.5×10^{-3} μ mol/L。细胞与上述样品孵育4 h后, 每孔加入5 mg/mL的MTT溶液10 μ L, 继续孵育4 h。然后吸出培养基, 每孔加入DMSO 200 μ L, 继续孵育, 10 min后用酶标仪测定每孔的 A_{570} 。细胞抑制率(inhibition rate, IR)如式(5)所示:

$$IR(\%) = (1 - A_1/A_2) \times 100 \quad (5)$$

式(5)中, A_1 和 A_2 分别代表样品和阳性对照组(纯DMEM组)在570 nm处的吸收度。

3 结果与讨论

3.1 相关材料的表征

3.1.1 CAT@HA-DOX-IR808 NPs的表征 从TEM图像中可观察到CAT@HA-DOX-IR808 NPs呈均匀的类球形, 尺寸约为75 nm(图4-A)。由于HA具有很强的亲水性, 所以在进行水合粒径的检测时, HA的大量吸水所导致的溶胀效应使得其测出来的水合粒径远大于TEM下的粒径, 经过检测平均水合粒径约为247 nm(图4-B)。接下来, 通过紫外可见光谱和荧光光谱验证DOX与IR808成功偶联到HA上。如图4-C所示, DOX和IR808分别在486和776 nm处有紫外特征吸收峰。HA-DOX NPs、HA-DOX-IR808 NPs和CAT@HA-DOX-IR808

NPs均在DOX和/或IR808的对应位置出现响应的特征吸收峰, 证明了DOX和IR808在上述纳米材料中的成功连接。荧光光谱进一步证实了上述结论。从荧光光谱(图4-D和4-E)中可以观察到DOX和IR808分别在592和795 nm处有荧光特征峰, 相关的纳米材料也显示出了DOX和/或IR808对应的荧光特征峰。然后, 用SDS-PAGE验证CAT的成功连接。如图4-F所示, CAT分子的单体蛋白条带约为60 kD(条带2), CAT@HA-DOX-IR808 NPs(条带3)中在60 kD处也出现明显条带, 说明CAT@HA-DOX-IR808 NPs中含有CAT, 其中条带1为标准品, 用于对照。

3.1.2 相关纳米材料的表征 对HA-DOX NPs、HA-DOX-IR808 NPs和CAT@HA NPs进行了表征。TEM图像显示, HA-DOX NPs呈近球形, 大小为50 nm, 而HA-DOX-IR808和CAT@HA NPs则呈现不均匀形态, 大小约为50和75 nm(图5-A ~ 5-C)。HA-DOX、HA-DOX-IR808和CAT@HA NPs的平均水合粒径分别约为175, 200和210 nm(图5-D ~ 5-F)。

3.2 DOX的体外释放实验

根据DOX在486 nm处存在紫外特征吸收峰, 得到了DOX浓度与 A_{486} 的标准曲线为 $y = 0.00972x - 0.00248$ ($R^2 = 0.999$)。计算得DOX-载药量为 $(9.82 \pm 0.3)\%$, DOX-包封率为 $(59.57 \pm 2.1)\%$ 。然后, 以包含不同的pH和HAase的PBS为外界刺激, 考察了CAT@HA-DOX-IR808 NPs的药物释放情况。如图6-A所示, 在pH 7.4和pH 5.0情况下, DOX在48 h内的释放率分别为38%和56%。在pH 5.0和HAase同时存在的条件下, DOX的释放量迅速增加, 约80%的DOX在最初的10 h内就表现出快速释放, 并在48 h达到近95%的释放率, 这主要是由于HAase对HA的水解以及对于pH敏感的酰胺键的断裂从而加速了DOX的大量释放。以上结果表明, CAT@HA-DOX-IR808 NPs具有良好的pH和HAase响应的药物释放能力。

3.3 过氧化氢酶的含量及稳定性实验

3.3.1 过氧化氢酶的含量测定 根据BSA溶液在不同浓度条件下的 A_{562} 获得BCA标准曲线为 $y = 0.0012x + 0.06927$ ($R^2 = 0.994$), 计算出CAT约占整个CAT@HA-DOX-IR808 NPs的 $(57.6 \pm 0.7)\%$ 。

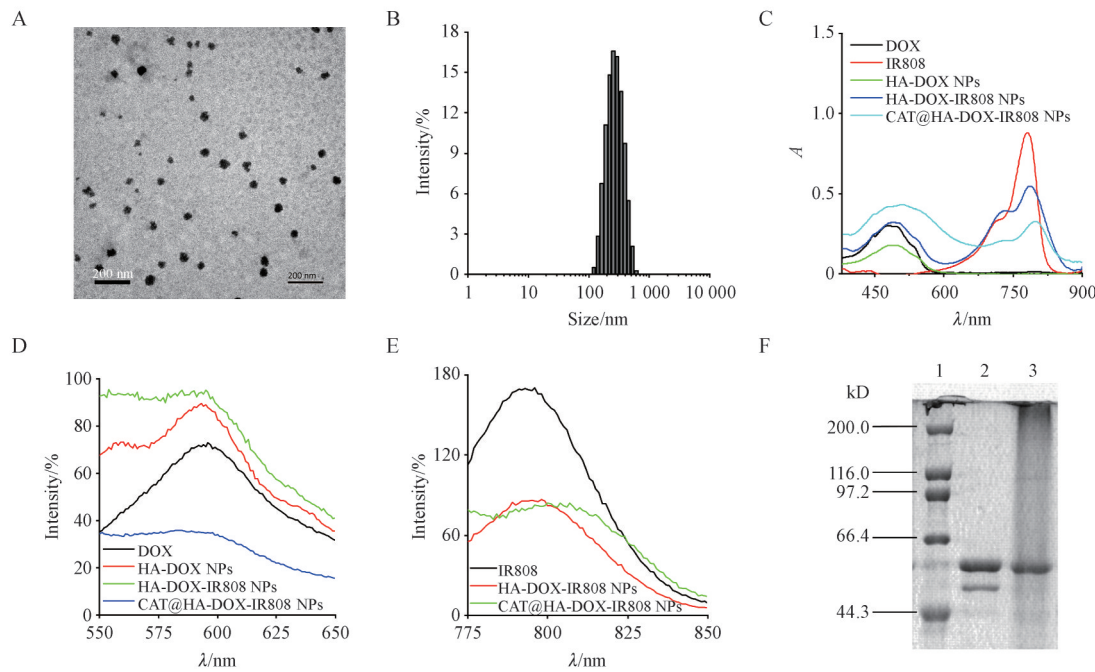


Figure 4 Characterization of the CAT@HA-DOX-IR808 NPs and other control NPs
A: TEM image of CAT@HA-DOX-IR808 NPs; B: Average hydrated particle size of CAT@HA-DOX-IR808 NPs; C: Ultraviolet-visible spectra; D: Fluorescence spectra; E: Fluorescence spectra; F: SDS-PAGE image(Lane 1: Marker; Lane 2: CAT; Lane 3: CAT@HA-DOX-IR808 NPs)

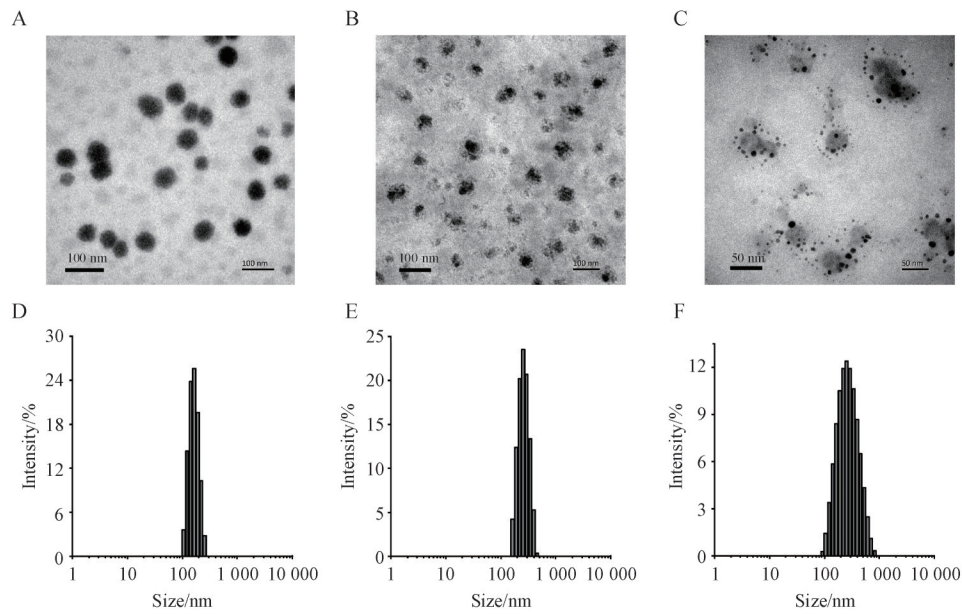


Figure 5 TEM images of (A) HA-DOX NPs, (B) HA-DOX-IR808 NPs, and (C) CAT@HA NPs and average hydrated particle sizes of (D) HA-DOX NPs, (E) HA-DOX-IR808 NPs, and (F) CAT@HA NPs

3.3.2 过氧化氢酶的稳定性评估 为了测试CAT的稳定性,通过文献[20]的方法评估了CAT的活性。如图6-B所示,5 h后游离CAT活性降至40%,而CAT@HA-DOX-IR808 NPs表现出优异的CAT活性,在5 h内保持了接近100%的活性,这表

明通过修饰和自组装成纳米材料可以提高CAT的稳定性。此外,CAT@HA NPs所表现出的CAT活性远低于CAT@HA-DOX-IR808 NPs,推测主要由两个原因导致:一方面,相比于CAT@HA-DOX-IR808 NPs,CAT@HA NPs本身大小较不均一,即

CAT@HA NPs本身的性质导致了其CAT的稳定性远低于CAT@HA-DOX-IR808 NPs;另一方面,CAT@HA-DOX-IR808 NPs中由于引入了富含亲水基团(羟基、氨基和羧基)的DOX和IR808,更利于形成具有保护作用的亲水层,从而使CAT@HA-DOX-IR808 NPs具有较好的CAT稳定性^[21]。

3.4 CAT@HA-DOX-IR808 纳米粒的稳定性实验

如图6-C所示,CAT@HA-DOX-IR808纳米探针在超纯水、0.01 mol/L PBS(pH 7.4)、DMEM这3种

介质中孵育5 d后没有明显的水合粒径尺寸变化,表明纳米探针在上述介质中具有良好的稳定性。

3.5 溶血性评估

溶血率是生物相容性评价的重要指标。当CAT@HA-DOX-IR808 NPs的质量浓度达到100 $\mu\text{g/mL}$ 时,仍然显示出很低的溶血率(2%)(图6-D),远低于会对人体造成伤害的浓度(10%),这说明CAT@HA-DOX-IR808 NPs具有良好的生物相容性。

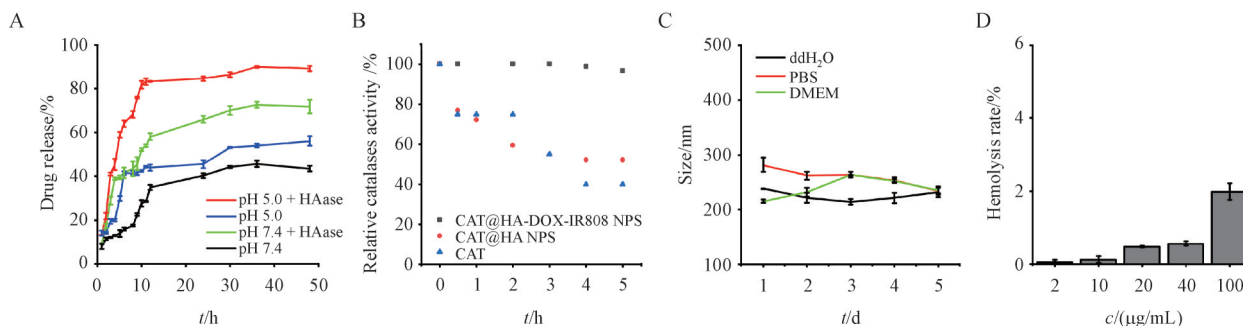


Figure 6 In vitro properties of CAT@HA-DOX-IR808 NPs ($n = 3$)

A: Release of DOX; B: Relative catalases activity; C: Particle size; D: Hemolytic toxicity

3.6 单线态氧的检测实验

为了检测CAT@HA-DOX-IR808 NPs产生单线态氧的能力,在溶液中使用ABDA作为荧光探针。当单线态氧存在时,ABDA会与其反应,从而产生荧光猝灭的现象,荧光强度减弱。根据IR808的浓度及其对应的 A_{776} ,得标准曲线为 $y = 0.14788x + 0.007617$ ($R^2 = 0.999$),计算出加载上的IR808约占整个CAT@HA-DOX-IR808 NPs的 $(4.73 \pm 1.3)\%$ 。在NIR光照射下,IR808对ABDA的荧光抑制作用呈现浓度依赖关系。当IR808的质量浓度为400 $\mu\text{g/mL}$ 时,0和2 min之间的荧光强度差异达到最大(图7-A),即选择该浓度作为后续CAT@HA-DOX-IR808 NPs中IR808参与反应的浓度。

接下来,对CAT@HA-DOX-IR808 NPs的产生单线态氧的能力进行了评估。结果显示,ABDA的荧光强度随着照射时间的增加而逐渐降低,表明CAT@HA-DOX-IR808 NPs的构建并没有破坏IR808产生单线态氧的能力(图7-B)。此外,氧气的增加有利于发挥光动力作用,在 H_2O_2 的存在下,CAT能与 H_2O_2 反应生成氧气,ABDA的荧光猝灭效果更加明显(图7-C)。

3.7 细胞内活性氧检测实验

非荧光物质DCFH-DA在参与活性氧反应后可转化为有荧光的DCF。如图8-A所示,在MDA-MB-231细胞(高表达CD44)中,IR808和CAT@HA-DOX-IR808 NPs在NIR光照射下的荧光强度都明显高于相对应的未经NIR光照射的组别。在NIR光照射下,DCF的荧光强度在CAT@HA-DOX-IR808 NPs组中比IR808组要明显许多,这表明CAT@HA-DOX-IR808 NPs可以通过靶向MDA-MB-231细胞表面过度表达的CD44来实现IR808的高效传递。而在HEK-293细胞(低表达CD44)中,无论有无NIR光照射,均未观察到明显的荧光信号(图8-B),CAT@HA-DOX-IR808 NPs可以以被动扩散的方式进入HEK-293细胞,但进入细胞的量较低。因此,在HEK-293细胞中产生的活性氧较少,DCF的荧光信号较弱。

3.8 细胞摄取与细胞内成像实验

通过激光共聚焦荧光显微镜和流式细胞仪进一步研究了CAT@HA-DOX-IR808 NPs在MDA-MB-231和HEK-293细胞内的摄取和成像情况。如图9-A所示,MDA-MB-231细胞(CD44高表达)与DOX和IR808孵育后具有较弱的DOX(绿色)和

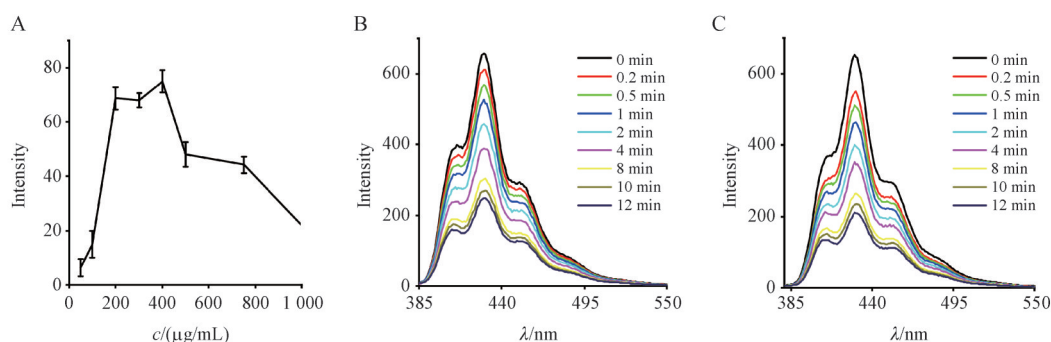


Figure 7 Ability of producing singlet oxygen of IR808/CAT@HA-DOX-IR808 NPs

A: Changes of fluorescence intensity of ABDA + IR808 after irradiation for 2 min at different concentration of IR808 ($n = 3$); B: Fluorescence intensity of different irradiation times of ABDA + CAT@HA-DOX-IR808 NPs; C: Fluorescence intensity of different irradiation times of ABDA + CAT@HA-DOX-IR808 NPs + H_2O_2 (NIR irradiation: 808 nm, 0.5 W/cm^2)

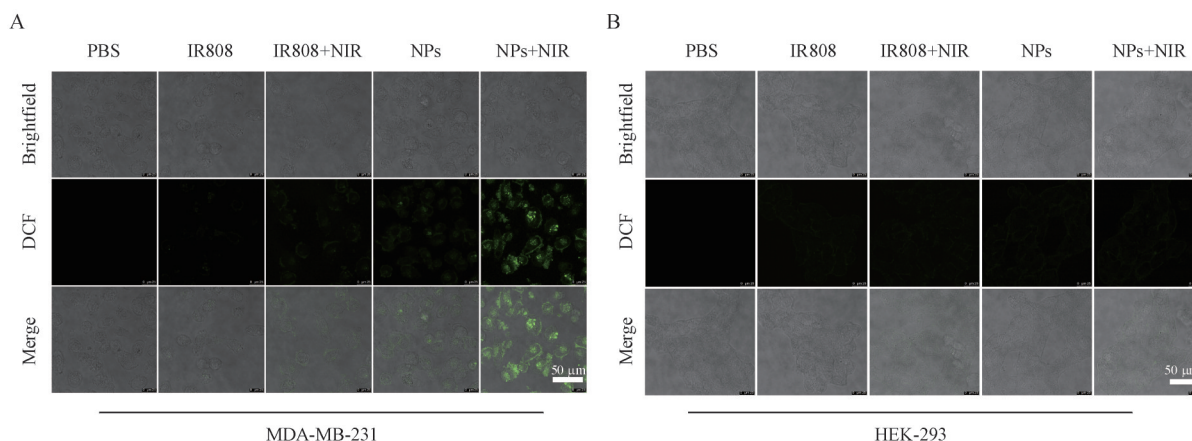


Figure 8 Confocal images of DCF for detection of reactive oxygen species generation in MDA-MB-231 cells (A) and HEK-293 cells (B) NIR irradiation (808 nm, 0.5 W/cm^2) for 2 min. Green: DCF (E_{ex} was 502 nm and E_{em} was 520–540 nm); Scale bars: 50 μm

IR808 (红色) 荧光信号, 而当与 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 孵育时, MDA-MB-231 细胞展现出比游离药物更显著的荧光信号, 这表明 HA 和 CD44 之间的靶向作用可以更有效地将药物输送到细胞。与 HEK-293 细胞 (CD44 低表达) (图 9-B) 相比, 经过 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 孵育后, MDA-MB-231 细胞具有更强的荧光信号, 即 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 更容易进入 CD44 高表达的细胞。通过在 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 进行孵育之前 HA 的提前孵育, 该组的 MDA-MB-231 细胞显示出的荧光强度比只进行 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 孵育组的荧光强度弱得多, 这是由于游离的 HA 先与 CD44 受体结合, 占据了 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 的结合位点, 从而导致了 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 进入细胞的数量明显减少。上述结果也表明, DOX、IR808 和 CAT 的修饰不会导致 HA 靶向 CD44

的能力失活。

流式细胞仪分析结果进一步证实了上述结果。用 DOX 的荧光强度来验证 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 进入细胞的情况。DOX 在 MDA-MB-231 细胞 (图 9-C) 中的荧光强度明显高于 HEK-293 (图 9-D)。与其他组相比, CAT@HA-DOX-IR808 NPs 组处理的 MDA-MB-231 细胞显示出最高的荧光强度。这些结果表明, HA 对 CD44 的靶向作用增强了细胞对 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 的摄取。

3.9 体外抗肿瘤活性实验

通过 MTT 法评价 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 的抗肿瘤作用。如图 10-A 所示, 在 MDA-MB-231 细胞中, 在所有测试浓度下, CAT@HA-DOX-IR808 NPs + NIR 组的细胞存活率明显低于 DOX 组、IR808 + NIR 组和 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 组, 这表明 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 的化疗-光动力联

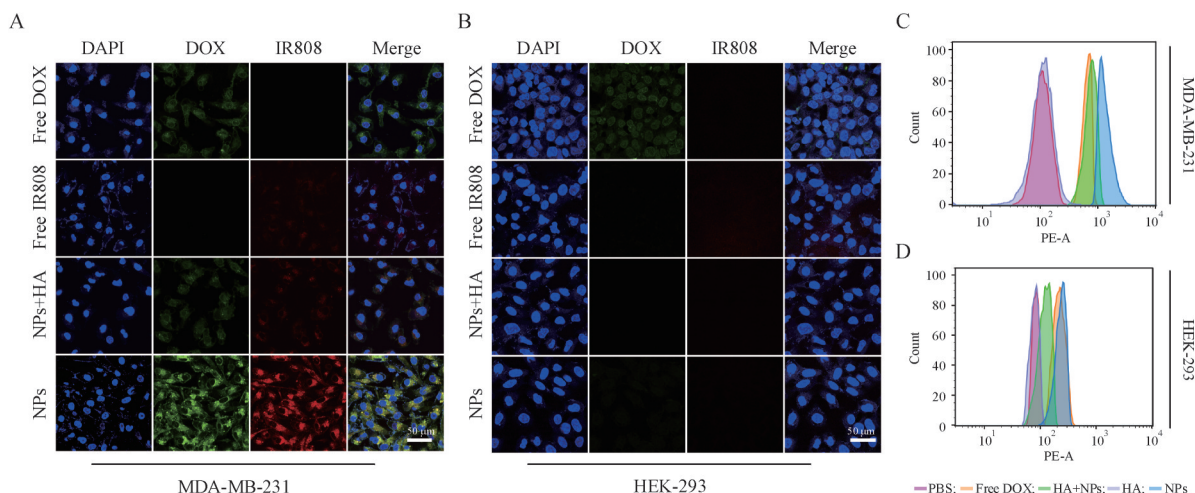


Figure 9 Cellular uptake of MDA-MB-231 and HEK-293 cells

Confocal images of MDA-MB-231 cells (A) and HEK-293 cells (B) and flow cytometry analysis of DOX entry of MDA-MB-231 cells (C) and HEK-293 cells (D). Blue: DAPI (E_x was 405 nm and E_m was 420–460 nm); Green: DOX (E_x was 486 nm and E_m was 575–590 nm); Red: IR808 (E_x was 750 nm and E_m was 750–780 nm); Scale bars: 50 μ m

合疗法具有比单一疗法更显著的抗肿瘤作用。在 NIR 光照射下,只有大约 40% 的 MDA-MB-231 细胞在最高浓度的 CAT@HA-DOX-IR808 NPs 下存活。

HEK-293 细胞作为 CD44 低表达细胞,与 MDA-MB-231 细胞存在不同的结果。如图 10-B 所示,在所有测试浓度下,HEK-293 细胞的活力明显

强于 MDA-MB-231 细胞。此外, CAT@HA-DOX-IR808 NPs 的化疗-光动力联合疗法的抗肿瘤作用甚至不如单纯的 DOX 化疗。这些结果表明, CAT@HA-DOX-IR808 NPs 可以通过自身靶向递送、化疗-光动力治疗的协同作用从而达到更强的抗肿瘤活性。

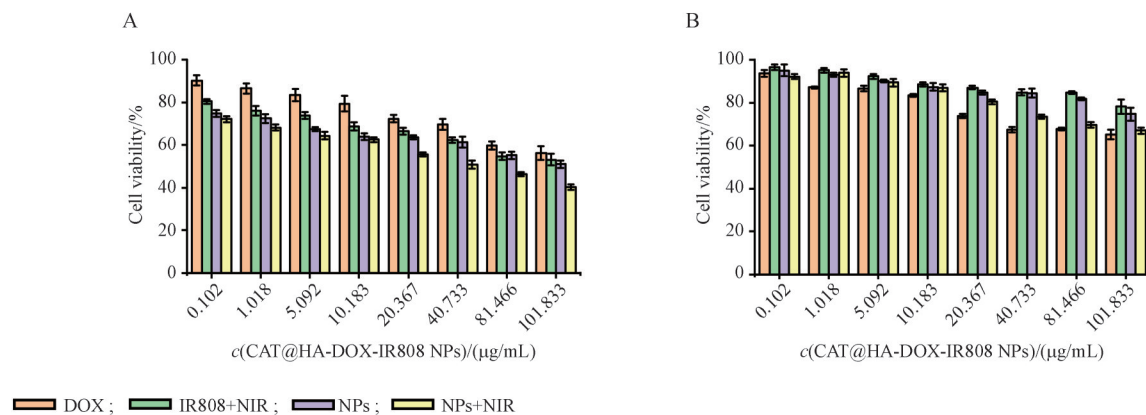


Figure 10 Intracellular anti-tumor activity of CAT@HA-DOX-IR808 NPs in MDA-MB-231 cells (A) and HEK-293 cells (B) ($\bar{x} \pm x$, $n = 3$)

The concentration of CAT@HA-DOX-IR808 NPs of every group were (A) 0.102 μ g/mL, (B) 1.018 μ g/mL, (C) 5.092 μ g/mL, (D) 10.183 μ g/mL, (E) 20.367 μ g/mL, (F) 40.733 μ g/mL, (G) 81.466 μ g/mL and (H) 101.833 μ g/mL. NIR irradiation (808 nm, 0.5 W/cm²) for 2 min

4 结论

本研究开发了一种基于 HA、DOX、IR808 和 CAT 自组装的用于乳腺癌体外荧光成像和治疗的纳米探针 CAT@HA-DOX-IR808 NPs。该纳米探针具有良好的稳定性、生物相容性以及酸性肿瘤

微环境中快速释放药物的能力。该纳米探针具有以下 4 个优点: (1) 通过 HA 靶向乳腺癌细胞表面过表达的 CD44 受体, 可实现高效的靶向药物递送; (2) IR808 可以实现乳腺癌细胞的 NIR 荧光成像; (3) CAT 与 H₂O₂ 反应产生氧气, 可以提高光动

力治疗的效果;(4)在肿瘤微环境(酸性)中,可实现 pH 响应性药物释放,快速释放出 DOX,在 NIR 的照射下发挥化疗-光动力治疗的协同作用,具有增强抗肿瘤效果的作用。因此,本研究构建的纳米探针在乳腺癌的体外荧光成像和治疗中具有良好的应用前景。

References

- [1] Tavianatou AG, Piperigkou Z, Koutsakis C, *et al.* The action of hyaluronan in functional properties, morphology and expression of matrix effectors in mammary cancer cells depends on its molecular size[J]. *FEBS J*, 2021, **288**(14):4291-4310.
- [2] Aghamiri S, Zandsalimi F, Raei P, *et al.* Antimicrobial peptides as potential therapeutics for breast cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2021, **171**:105777.
- [3] Zhu YQ, Feijen J, Zhong ZY. Dual-targeted nanomedicines for enhanced tumor treatment[J]. *Nano Today*, 2018, **18**:65-85.
- [4] Tavianatou AG, Piperigkou Z, Barbera C, *et al.* Molecular size-dependent specificity of hyaluronan on functional properties, morphology and matrix composition of mammary cancer cells [J]. *Matrix Biol Plus*, 2019, **3**:100008.
- [5] Cai J, Fu JR, Li RR, *et al.* A potential carrier for anti-tumor targeted delivery-hyaluronic acid nanoparticles [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, **208**:356-364.
- [6] Matricardi P, di Meo C, Coviello T, *et al.* Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(9):1172-1187.
- [7] Dzobo K, Sinkala M. Cancer stem cell marker CD44 plays multiple key roles in human cancers: immune suppression/evasion, drug resistance, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis[J]. *OMICS*, 2021, **25**(5):313-332.
- [8] Zhang YB, Li Y, Tian HN, *et al.* Redox-responsive and dual-targeting hyaluronic acid-methotrexate prodrug self-assembling nanoparticles for enhancing intracellular drug self-delivery[J]. *Mol Pharm*, 2019, **16**(7):3133-3144.
- [9] Ashrafizadeh M, Mirzaei S, Gholami MH, *et al.* Hyaluronic acid-based nanoplateforms for Doxorubicin: a review of stimuli-responsive carriers, co-delivery and resistance suppression[J]. *Carbohydr Polym*, 2021, **272**:118491.
- [10] Cui H, Huan ML, Ye WL, *et al.* Mitochondria and nucleus dual delivery system to overcome DOX resistance [J]. *Mol Pharm*, 2017, **14**(3):746-756.
- [11] Popescu RC, Savu DI, Bierbaum M, *et al.* Intracellular delivery of doxorubicin by iron oxide-based nano-constructs increases clonogenic inactivation of ionizing radiation in HeLa cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(13):6778.
- [12] Hou WX, Zhao X, Qian XQ, *et al.* pH-Sensitive self-assembling nanoparticles for tumor near-infrared fluorescence imaging and chemo-photodynamic combination therapy [J]. *Nanoscale*, 2016, **8**(1):104-116.
- [13] Phua SZF, Yang GB, Lim WQ, *et al.* Catalase-integrated hyaluronic acid as nanocarriers for enhanced photodynamic therapy in solid tumor[J]. *ACS Nano*, 2019, **13**(4):4742-4751.
- [14] Feng L, Chen MY, Li RH, *et al.* Biodegradable oxygen-producing manganese-chelated metal organic frameworks for tumor-targeted synergistic chemo/photothermal/photodynamic therapy [J]. *Acta Biomater*, 2022, **138**:463-477.
- [15] Li SP, Sun ZH, Deng GJ, *et al.* Dual-modal imaging-guided highly efficient photothermal therapy using heptamethine cyanine-conjugated hyaluronic acid micelles [J]. *Biomater Sci*, 2017, **5**(6):1122-1129.
- [16] Cai Y, Si WL, Huang W, *et al.* Organic dye based nanoparticles for cancer phototheranostics [J]. *Small*, 2018, **14** (25): e1704247.
- [17] Wang SJ, Tang QQ, Ya HY, *et al.* Study on the optical and biological properties *in vitro* of IR808-PEG-FA [J]. *J Biomed Mater Res*, 2020, **108**(9):1816-1823.
- [18] Leitão MM, de Melo-Diogo D, Alves CG, *et al.* Prototypic heptamethine cyanine incorporating nanomaterials for cancer phototheragnostic[J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, **9**(6):e1901665.
- [19] Liu SS, Song RX, Li XS, *et al.* Synergistic therapeutic strategies for cancer treatment based on nanophototherapy [J]. *Nanophotonics*, 2021, **10**(12):3391-3395.
- [20] Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range [J]. *Clin Chim Acta*, 1991, **196**(2/3):143-151.
- [21] Cheng X, He L, Xu JX, *et al.* Oxygen-producing catalase-based prodrug nanoparticles overcoming resistance in hypoxia-mediated chemo-photodynamic therapy [J]. *Acta Biomater*, 2020, **112**:234-249.