

多种放射性核素标记聚多巴胺纳米载体的初步应用评价

李亚渊¹ 安杰¹ 贺鑫怡¹ 菅少洁¹ 崔曹哲¹ 鄢敏¹ 高洁² 武志芳¹

¹山西医科大学第一医院核医学科,太原 030001;²国家原子能机构核技术(放射性药物非临床评价)研发中心,太原 030006

通信作者:武志芳, Email: wuzhifang01@163.com

【摘要】 目的 制备¹³¹I、⁹⁹Tc^m和¹⁷⁷Lu标记的表面修饰了声敏剂原卟啉(PpIX)的聚多巴胺(PDA),探讨这些新型化纳米探针在乳腺癌诊断与联合治疗中的价值。方法 采用水相氧化法合成PDA颗粒,并在其表面分别修饰1层聚乙二醇(PEG)和PpIX,合成PDA-PEG-PpIX。然后分别进行¹³¹I、⁹⁹Tc^m和¹⁷⁷Lu标记,检测标记产率与稳定性。进行细胞毒性实验,比较¹³¹I-PDA-PEG-PpIX组和游离¹³¹I组小鼠乳腺癌细胞4T1的存活率差异;设PDA-PEG-PpIX、PDA-PEG-PpIX+光热治疗(PTT)或声动力治疗(SDT)、¹³¹I-PDA-PEG-PpIX+PTT或SDT、¹³¹I-PDA-PEG-PpIX+PTT+SDT(100 μg/ml PDA-PEG-PpIX, 925 kBq/ml ¹³¹I)组和对照组(DMEM培养基),比较各组4T1细胞的存活率。经荷4T1乳腺癌BALB/c小鼠尾静脉(29.6 MBq)或瘤内(14.8 MBq)注射⁹⁹Tc^m-PDA-PEG-PpIX后,用γ相机观察肿瘤的显像剂摄取情况。采用两独立样本t检验和单因素方差分析进行数据分析。结果 PDA颗粒大小均一,粒径为(160.0±1.5) nm,具有良好的光热转换效果。PDA-PEG-PpIX紫外-可见吸收光谱中出现了与PpIX(400 nm)相一致的特征峰。在放射性浓度为1.850、3.700和7.400 MBq/ml时,¹³¹I-PDA-PEG-PpIX组较游离¹³¹I组细胞存活率降低[(72.18±6.57)%与(86.07±5.17)%、(59.31±9.06)%与(80.85±4.21)%、(42.90±1.30)%与(72.99±5.73)%];t值:3.71、4.82、11.46, P值:0.006、0.001、<0.001。¹³¹I-PDA-PEG-PpIX+PTT+SDT的三模态联合治疗对4T1肿瘤细胞的杀伤效果优于¹³¹I-PDA-PEG-PpIX+PTT或SDT治疗[细胞存活率:(10.09±2.50)%、(16.04±2.63)%和(28.65±4.72)%;F=351.66, P<0.001]。γ显像示,⁹⁹Tc^m-PDA-PEG-PpIX在小鼠体内稳定且能够在肿瘤内有效富集。结论 成功制备了以PDA为载体的多功能纳米探针。核素标记方法简单有效,稳定性好。¹³¹I-PDA-PEG-PpIX对4T1细胞杀伤能力强。⁹⁹Tc^m-PDA-PEG-PpIX在荷4T1乳腺癌小鼠模型内有明显的肿瘤浓聚效果。

【关键词】 乳腺肿瘤;纳米粒子;聚合物;原卟啉类;同位素标记;肿瘤细胞,培养的;小鼠

基金项目:国家自然科学基金(81971655, 82102103)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20220210-00042

Preliminary application evaluation of polydopamine nano-carriers labeled with multiple radionuclides

Li Yayuan¹, An Jie¹, He Xinyi¹, Jian Shaojie¹, Cui Caozhe¹, Yan Min¹, Gao Jie², Wu Zhifang¹

¹Department of Nuclear Medicine, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

²National Atomic Energy Agency Nuclear Technology (Non Clinical Evaluation of Radioactive Drugs) Center, Taiyuan 030006, China

Corresponding author: Wu Zhifang, Email: wuzhifang01@163.com

【Abstract】 Objective To prepare nanoprobes by using polydopamine (PDA) as a carrier which is modified with the sonosensitizer protoporphyrin IX (PpIX) and labeled with ¹³¹I, ⁹⁹Tc^m or ¹⁷⁷Lu, and to explore the value of these new nanoprobes in diagnosis and combination therapy of breast cancer. **Methods** PDA particles were synthesized by aqueous oxidation, and a layer of polyethylene glycol (PEG) and PpIX were modified on the surface to product PDA-PEG-PpIX. Then the nuclides ¹³¹I, ⁹⁹Tc^m and ¹⁷⁷Lu were labeled on PDA, respectively, and the labeling yield and stability were determined. The cytotoxicity test was conducted by comparing the viabilities of 4T1 tumor cells in free ¹³¹I group and ¹³¹I-PDA-PEG-PpIX group. The 4T1 cells were divided into 7 groups according to different treatment methods: PDA-PEG-PpIX group, PDA-PEG-PpIX+photothermal therapy (PTT) group, PDA-PEG-PpIX+sonodynamic therapy (SDT) group, ¹³¹I-PDA-PEG-PpIX+PTT group, ¹³¹I-PDA-PEG-PpIX+SDT group, ¹³¹I-PDA-PEG-PpIX+PTT+SDT group (100 μg/ml PDA-PEG-PpIX, 925 kBq/ml ¹³¹I), and the control group (DMEM culture medium). The

cell viabilities of those groups were compared to evaluate the therapeutic effect. 4T1 tumor bearing mouse models were established, then $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -PDA-PEG-PpIX was injected through the tail vein (29.6 MBq) or intratumorally (14.8 MBq) to perform gamma imaging. The independent-sample *t* test and one-way analysis of variance were used for data analysis. **Results** The PDA particles were uniform in size, with a particle size of (160.0±1.5) nm. They had a good photothermal conversion effect. A characteristic peak consistent with PpIX (400 nm) appeared in the UV-Vis absorption spectrum of PDA-PEG-PpIX. In the cytotoxicity test, when the radioactivity was 1.850 or 3.700 or 7.400 MBq/ml, the cell viabilities of free ^{131}I group and ^{131}I -PDA-PEG-PpIX group were significantly different ((72.18±6.57)% vs (86.07±5.17)%, (59.31±9.06)% vs (80.85±4.21)%, (42.90±1.30)% vs (72.99±5.73)%); *t* values: 3.71, 4.82, 11.46, *P* values: 0.006, 0.001, <0.001). The ^{131}I -PDA-PEG-PpIX+PTT+SDT combination therapy had a better killing effect on 4T1 tumor cells than the combination of ^{131}I -PDA-PEG-PpIX+PTT and ^{131}I -PDA-PEG-PpIX+SDT (cell viabilities: (10.09±2.50)% vs (16.04±2.63)%, (28.65±4.72)%); *F*=351.66, *P*<0.001). *In vivo* imaging showed that $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -PDA-PEG-PpIX was stable in mouse models and could be effectively enriched in tumors. **Conclusions** A multifunctional nanoprobe based on PDA is successfully prepared. The radionuclide labeling method is simple and effective, with a good stability. ^{131}I -PDA-PEG-PpIX can kill 4T1 cells efficiently. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -PDA-PEG-PpIX has an obvious tumor concentration effect in mouse models.

【Key words】 Breast neoplasms; Nanoparticles; Polymers; Porphyrins; Isotope labeling; Tumor cells, cultured; Mice

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81971655, 82102103)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20220210-00042

肿瘤靶向多模态成像和治疗为肿瘤诊疗一体化带来了巨大的潜力,其中核医学分子影像技术被广泛用于癌症早期检查。同时,一些治疗性核素还能够杀死肿瘤细胞^[1]。然而,核素分子特异性差且易在体内快速消除,会导致疗效降低。研究表明纳米颗粒可以使放射性核素标记简易化^[2],并将其定向输送到肿瘤部位,从而提高治疗效果。纳米载体由于具有尺寸可控、比表面积较大、易于修饰等独特的理化性质,可为核素标记以及药物负载提供便捷的方法^[3]。本研究旨在以聚多巴胺 (polydopamine, PDA) 纳米颗粒为载体,负载声敏剂原卟啉 (protoporphyrin IX, PpIX) 并进行多种核素标记,开发可用于联合治疗的多功能纳米载体,拟为目前肿瘤诊疗提供新的策略。

材料和方法

1. 实验试剂与材料。盐酸多巴胺、PpIX、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC] 和 *N*-羟基琥珀酰亚胺 (*N*-hydroxysuccinimide, NHS) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid, DOTA) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 购自陕西瑞禧生物有限公司; 单线态氧绿色荧光探针 (singlet oxygen sensor green, SOSG) 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Na^{131}I 、 $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ 购自上海原子科兴药业有限公司; 4T1 小鼠乳腺癌细胞购自武汉普诺赛生命

科技有限公司; CCK-8 (cell counting kit-8) 试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; 紫外可见分光光度计 (UH 5300)、荧光分光光度计 (F-7000) 购自日立(中国)有限公司; MDL-III-808-2.5 W 激光器购自长春新产业光电技术有限公司; 全数字超声治疗仪购自深圳市威尔德医疗电子有限公司; Spectra Max 酶标仪购自北京五洲东方科技发展有限公司。

2. 实验动物。雄性 BALB/c 小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司 [实验动物生产许可证号: SCXK(京)2019-0010], 共 3 只, 4~6 周龄, 体重 20~25g, 常规饲养于无特殊病原体级动物房中。本研究动物实验遵循了国家和山西医科大学有关实验动物管理和使用的规定, 实验动物使用许可证号: SYXK(晋)2019-0007。

3. PDA-PEG-PpIX 的合成。将 90 ml 超纯水 150 ml 加入圆底烧瓶内, 油浴加热至 50 ℃, 然后加入 180 mg 盐酸多巴胺, 调节 pH 值至 8.5。反应体系由无色逐渐变为黄色再变成深棕色。5 h 后收集反应液, 以 4 000 r/min 离心 5 min (离心半径 12.3 cm) 后取上清, 去除尺寸过大的颗粒, 得到大小均一的 PDA 纳米颗粒。取 5 ml PDA (6 mg/ml) 加入至 50 ml 圆底烧瓶内, 调节 pH 值至 9, 加入 30 mg PEG, 在室温下搅拌 2 h, 以 12 000 r/min 离心 10 min (离心半径 12.3 cm), 清洗 3 次后得到 PDA-PEG。

称取 10 mg PpIX、76.68 mg EDC 和 15.34 mg NHS 溶于 5 ml 甲醇中活化 30 min, 调节溶液 pH 值至 9, 加入 1 ml PDA-PEG (10 mg/ml) 避光搅拌过

夜,以 12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 12.3 cm),收集得到最终的 PDA-PEG-PpIX,于 4 °C 避光保存。

4. PDA-PEG 体外光热效果评价。取 50、100、200、300 和 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PDA-PEG 分散体系,在 808 nm 近红外激光下(1.5 W/cm^2 , 5 min)记录其升温效果。取 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PDA-PEG 分散体系,在不同近红外激光功率(1.0、1.5、2.0 和 2.5 W/cm^2)照射 5 min,每隔 10 s 记录 1 次温度,并绘制升温曲线。同时设 PBS 对照组。

5. PDA-PEG-PpIX 体外单线态氧检测。以 PBS 为对照组,相同探针浓度下不同功率实验组用不同超声功率(1.0、1.5、2.0、2.5 W/cm^2)激发 PDA-PEG-PpIX(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$),同一功率不同超声次数实验组则是每隔 1 min 超声 1 次,分别超声 1、3 和 5 min(超声功率:1.5 W/cm^2 , PDA-PEG-PpIX 质量浓度:100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。采用 SOSG 测定 PDA-PEG-PpIX 单线态氧产生情况。

6. 核素标记和标记产物稳定性检测。 ^{131}I 标记:66.6 MBq Na^{131}I 、100 μl 氯胺 T 溶液、5 ml PDA-PEG-PpIX(2 mg/ml)混合后室温下搅拌 15 min。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记:37 MBq $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ 溶液、200 μl SnCl_2 (5 mg/ml、0.1 mol/L HCl)与 5 ml PDA-PEG-PpIX(0.2 mg/ml)混合后室温下搅拌 1 h。 ^{177}Lu 标记:取 5 ml PDA-PEG-PpIX(2 mg/ml),加入 NaOH 调节 pH 值至 8.5 后,取 10 mg DOTA 加入反应体系中搅拌过夜^[4]。最后取 37 MBq 的 $^{177}\text{LuCl}_3$ (185 MBq/ml, 0.04 mol/L HCl)加入到反应体系中室温下搅拌 1 h^[5]。

将标记核素后的探针分别置于 2 ml PBS 和含体积分数 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在不同时间点(^{131}I 和 ^{177}Lu 标记后 0、0.5、1、2、4、6、24、72、120 h; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记后 0、1、2、4 h)测定放射性计数(radioactive counts, RC),初次记作 RC_0 ,以 10 000 r/min 离心 10 min(离心半径 12.3 cm),将离心后沉淀的 RC 记作 RC_1 ,核素稳定性= $\text{RC}_1/\text{RC}_0 \times 100\%$ 。

7. 体外毒性检测与治疗。取对数生长期的 4T1 细胞接种于 96 孔板内,每组设 5 个孔,每孔加入 8×10^3 个细胞。待细胞贴壁后,对照组加入 DMEM 完全培养基,实验组加入不同放射性浓度(0.462、0.925、1.850、3.700、7.400 MBq/ml)的 ^{131}I -PDA-PEG-PpIX 和游离 ^{131}I 溶液,置于培养箱温育 4 h。随后弃培养基, PBS 冲洗 3 次,每孔加入新鲜完全培养基继续温育 20 h。加入 CCK-8 试剂,2 h 后采用酶标仪检测每孔 450 nm 处的吸光度值,计算细胞存活率:(实验孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔

吸光度-空白孔吸光度) $\times 100\%$ 。

对 96 孔板内贴壁生长的 4T1 细胞进行分组处理,实验组分为 PDA-PEG-PpIX、PDA-PEG-PpIX+光热治疗(photothermal therapy, PTT)、PDA-PEG-PpIX+声动力治疗(sonodynamic therapy, SDT)、 ^{131}I -PDA-PEG-PpIX+PTT、 ^{131}I -PDA-PEG-PpIX+SDT 和 ^{131}I -PDA-PEG-PpIX+PTT+SDT 组,其中 PDA-PEG-PpIX 质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ^{131}I 放射性浓度为 925 kBq/ml,对照组加入等量 DMEM 培养基,温育 4 h 后分别采用 808 nm 激光器和超声治疗仪进行 PTT(1.5 W/cm^2 , 5 min)和 SDT(1.5 W/cm^2 , 5 min),继续温育 20 h 后用酶标仪检测细胞存活率。

8. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -PDA-PEG-PpIX 活体成像。取 3 只小鼠,在其右后肢皮下注射 10^7 个 4T1 细胞(100 μl),待肿瘤体积到 100 mm^3 时用于实验。对 2 只小鼠模型分别瘤内注射 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -PDA-PEG-PpIX 和游离 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ (14.8 MBq, 100 μl),在 0.5、2、4、6、8、10、12、24、36 和 48 h 用 γ 相机采集小鼠全身图像。对余下 1 只小鼠尾静脉注射 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -PDA-PEG-PpIX(29.6 MBq, 200 μl),于注射后上述相同时间点进行 γ 显像。

9. 统计学处理。采用 IBM SPSS 25.0 软件进行数据分析。符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(以 Levene 方差齐性检验来检验方差齐性),进一步两两比较行 Tukey 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. PDA-PEG-PpIX 表征。制备的 PDA 纳米颗粒粒径大小均一, PDA 水合粒径为(160.0 \pm 1.5) nm。PDA-PEG-PpIX 水合粒径为(281.0 \pm 7.5) nm。PDA 在修饰 PEG 和 PpIX 后电势由(-23.57 \pm 1.06) mV 变为(-14.43 \pm 0.51) mV。紫外可见吸收光谱显示 PDA-PEG-PpIX 吸收光谱出现了与 PpIX 一致的特征峰(400 nm;图 1)。

2. 光热与单线态氧释放评价。在同一激光功率(1.5 W/cm^2)的照射下,随着 PDA-PEG 质量浓度的增加,升温效果越明显。在质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,经 5 min 的激光照射后 PDA-PEG 温度上升到(59.60 \pm 0.57) °C;而在相同条件下 PBS 只能达到(24.00 \pm 0.25) °C(图 2)。在相同质量浓度下,温度随着激光功率增加而升高,2 W/cm^2 的 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PDA-PEG 温度上升到 80 °C 以上(图 3)。重复 5 个升温降温的循环,PDA-PEG 表现出良好的光热稳定

性(图4)。

随着超声功率的增加, PDA-PEG-PpIX释放的单线态氧荧光强度逐渐增强(图5A), 超声刺激1次后单线态氧荧光信号弱于超声3次和5次后的信号, 但超声3次和5次后的荧光强度并没有明显差异(图5B)。

3.核素标记产率及稳定性检测。¹³¹I、⁹⁹Tc^m和¹⁷⁷Lu标记产率分别为80.74%、81.00%和85.83%。在稳定性测试中,¹⁷⁷Lu稳定性最为优异,在PBS和DMEM中存放120h后仍然在90%以上。¹³¹I和⁹⁹Tc^m也具有较高的稳定性,¹³¹I在DMEM中存放120h后,稳定性为84.13%。而⁹⁹Tc^m半衰期较短,其在DMEM中存放4h后稳定性为86.58%。

4.体外毒性检测与治疗效果评估。对照组细胞存活率为100%。当放射性浓度为7.400 MBq/ml时,游离¹³¹I细胞存活率仍在70%以上,而¹³¹I-PDA-PEG-PpIX组细胞存活率仅为45%左右;当放射性浓度为1.850、3.700和7.400 MBq/ml时,细胞存活率逐渐降低,2组差异有统计学意义(表1)。

对4T1肿瘤细胞的杀伤效果¹³¹I-PDA-PEG-PpIX+PTT+SDT的三模态联合治疗对4T1肿瘤细胞的杀伤效果优于¹³¹I-PDA-PEG-PpIX+PTT或SDT治疗[细胞存活率:(10.09±2.50)%、16.04±2.63)%和(28.65±4.72)%;F=351.66,均P<0.001];PDA-PEG-PpIX+PTT和PDA-PEG-PpIX+SDT组的细胞存活率低于单独探针PDA-PEG-PpIX组[(60.06±6.08)%、

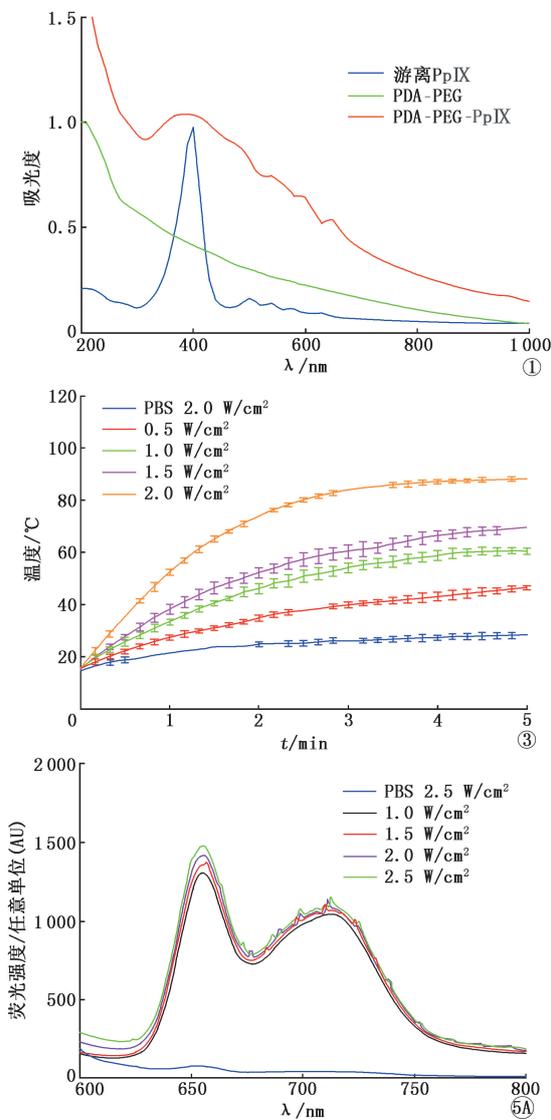


图1 各物质的紫外可见吸收光谱图。PDA为聚多巴胺,PEG为聚乙二醇,PpIX为原卟啉IX 图2 不同浓度PDA-PEG在同一近红外激光功率(1.5 W/cm²)下的温度变化图 图3 浓度为100 µg/ml的PDA-PEG在不同近红外激光功率下的温度变化图 图4 PDA-PEG近红外可控温度变化曲线 图5 PDA-PEG-PpIX在不同超声功率下(A)及不同超声次数后(B)释放单线态氧荧光强度的情况

表 1 各放射性浓度的¹³¹I-PDA-PEG-PpIX和游离¹³¹I 温育 4 h 后 4T1 细胞的存活率比较

| 探针放射性浓度 (MBq/ml) | 细胞存活率 (%; $\bar{x} \pm s$) | | t 值 | P 值 |
|------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------|--------|
| | 游离 ¹³¹ I | ¹³¹ I-PDA-PEG-PpIX | | |
| 0.462 | 93.13±8.03 | 84.22±5.53 | 2.05 | 0.075 |
| 0.925 | 86.06±10.46 | 82.43±4.93 | 0.70 | 0.502 |
| 1.850 | 86.07±5.17 | 72.18±6.57 | 3.71 | 0.006 |
| 3.700 | 80.85±4.21 | 59.31±9.06 | 4.82 | 0.001 |
| 7.400 | 72.99±5.73 | 42.90±1.30 | 11.46 | <0.001 |

注:PDA 为聚多巴胺,PEG 为聚乙二醇,PpIX 为原卟啉IX

(64.90±4.45)% 和 (93.00±6.42)%; $F = 435.60$, 均 $P < 0.001$]。

5. ⁹⁹Tc^m-PDA-PEG-PpIX 小鼠肿瘤显像。小鼠肿瘤内注射⁹⁹Tc^m-PDA-PEG-PpIX 和游离⁹⁹Tc^m 后, 肿瘤均有显影。游离⁹⁹Tc^m 在肝脏、甲状腺、膀胱等脏器也有明显聚集, 并且随着时间变化显影越来越明显; 而注射⁹⁹Tc^m-PDA-PEG-PpIX 的小鼠一直呈现肿瘤显影, 即使在 48 h 时肿瘤部位仍然有明显的显像剂分布 (图 6)。荷瘤小鼠尾静脉注射⁹⁹Tc^m-PDA-PEG-PpIX 后 0.5 h 肿瘤部位开始显影, 2 h 的肿瘤信号明显增强, 在 6 h 达高峰, 但小鼠整体背景比较高 (图 7)。

讨 论

核素治疗主要是利用核素衰变过程中产生的高能射线杀死肿瘤细胞, 如当前临床中广泛应用于甲状腺癌治疗的 β 型核素 ¹³¹I^[6]。但核素容易在体内快速消除和非特异地广泛分布于正常组织, 这会导

致疗效降低和对正常组织器官造成损害。纳米颗粒能够同时负载放射性核素和化疗药物、声敏剂等, 实现核素治疗与化疗、PTT、SDT 等联合治疗。其可以增强药物在体内血液循环时间, 肿瘤血管不完整和淋巴引流不良引起的增强渗透和滞留效应促使其在肿瘤中富集^[7-8]。纳米颗粒为新型诊疗一体化放射性核素探针的开发提供了好的平台。

本研究组采用水相氧化法合成了大小均一的 PDA 纳米颗粒, 并在其表面修饰 PEG 和负载声敏剂 PpIX, 进一步标记⁹⁹Tc^m、¹³¹I、¹⁷⁷Lu 3 种核素, 构建了新的多功能诊疗一体化纳米探针, 且核素标记率和稳定性均在 80% 以上。高效的标记率和稳定性为后续成像和治疗奠定了良好的基础。

本研究结果表明, PDA 纳米颗粒具有良好的光热效果, 通过调节激光功率和探针浓度达到可控光热治疗。研究显示, 当温度在 41~45 °C 时, 肿瘤细胞开始出现凋亡, 当温度超过 50 °C 后, 细胞凋亡减少转为更明显的细胞坏死^[9]。本研究中, 当探针质量浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, 经 5 min 的激光照射后温度上升到 (59.60±0.57) °C, 这一温度可达到杀死肿瘤细胞的目的。活性氧能够诱导肿瘤细胞氧化损伤, 从而引起其凋亡或者坏死, 还会导致线粒体的损伤、断裂和降解^[10]。由于肿瘤组织处于弱酸环境 (pH 值 6.4~6.8)^[11], PDA 纳米载体在酸性条件下会缓慢降解从而导致 PpIX 的释放, 超声进一步刺激能够促进单线态氧释放。本研究显示, 100 $\mu\text{g/ml}$

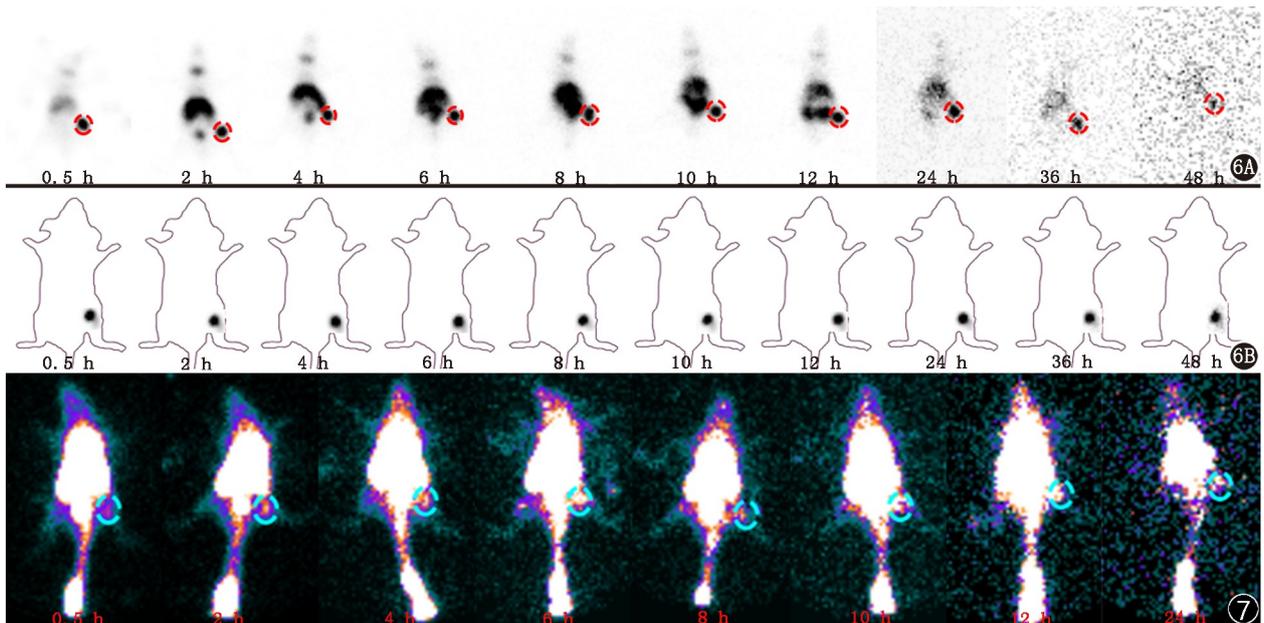


图 6 荷 4T1 乳腺癌小鼠瘤内分别注射游离⁹⁹Tc^m (6A) 和⁹⁹Tc^m-聚多巴胺 (PDA)-聚乙二醇 (PEG)-原卟啉IX (PpIX) (6B) 后不同时间点 γ 显像图 **图 7** 荷 4T1 乳腺癌小鼠尾静脉注射⁹⁹Tc^m-PDA-PEG-PpIX 后不同时间点 γ 显像图

探针在 1.5 W/cm² 功率超声激发下,释放单线态氧的量远大于对照组的 PBS。体外细胞实验示 PDA-PEG-PpIX+PTT 和 PDA-PEG-PpIX+SDT 组的细胞存活率显著低于单独探针 PDA-PEG-PpIX 组,进一步表明 100 μg/ml 的探针能够通过 PTT 和 SDT 杀死肿瘤细胞。另外,超声刺激 1 次后单线态氧荧光信号弱于超声 3 次和 5 次,但超声 3 次和 5 次后的荧光强度并没有明显差异,可能是因为 100 μg/ml PDA-PEG-PpIX 所含 PpIX 已在第 3 次超声后基本全部释放,表明可以通过调整投入药物质量和超声次数来控制单线态氧释放,从而达到最佳治疗效果。

本研究细胞实验示,当放射性浓度为 7.400 MBq/ml 时,游离¹³¹I 细胞存活率仍在 70% 以上,而¹³¹I-PDA-PEG-PpIX 组细胞存活率仅为 45% 左右,提示 PDA-PEG 纳米载体在细胞内聚集增加了¹³¹I 的摄取。¹³¹I-PDA-PEG-PpIX+PTT+SDT 的三模态联合治疗可以显著降低细胞存活率,比其他单一治疗或两两结合能够更多地抑制肿瘤细胞生长。

在荷 4T1 乳腺癌小鼠模型显像中,瘤内注射⁹⁹Tc^m-PDA-PEG-PpIX 能够稳定富集在肿瘤内,显像效果优于游离⁹⁹Tc^m。尾静脉注射⁹⁹Tc^m-PDA-PEG-PpIX 后 0.5 h 后肿瘤部位开始显影,2 h 的肿瘤信号明显增强,表明⁹⁹Tc^m-PDA-PEG-PpIX 能够在肿瘤部位迅速聚集,但存在小鼠整体背景比较高的问题。笔者将在下一步实验中在探针上添加主动靶向分子,将该探针用于活体疗效和毒性评价。

总之,本研究成功制备了以 PDA 为载体的多功能纳米探针。核素标记方法简单有效,稳定性好。核素标记探针对 4T1 细胞杀伤能力强,在荷 4T1 乳腺癌小鼠模型内有明显的肿瘤浓聚效果。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 李亚渊、安杰:研究设计、研究实施、数据分析、论文撰写;贺鑫怡、菅少洁:研究实施、数据采集;崔曹哲、鄢敏、高洁:统计学分析、研究指导;武志芳:论文修改、经费支持

参 考 文 献

[1] Kramer-Marek G, Capala J. The role of nuclear medicine in modern therapy of cancer [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33 (3): 629-640. DOI:10.1007/s13277-012-0373-8.

- [2] Ge J, Zhang Q, Zeng J, et al. Radiolabeling nanomaterials for multimodality imaging: new insights into nuclear medicine and cancer diagnosis [J]. *Biomaterials*, 2020, 228: 119553. DOI:10.1016/j.biomaterials.2019.119553.
- [3] Li X, Xiong Z, Xu X, et al. ^{99m}Tc-labeled multifunctional low-generation dendrimer-entrapped gold nanoparticles for targeted SPECT/CT dual-mode imaging of tumors [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8 (31): 19883-19891. DOI: 10.1021/acsami.6b04827.
- [4] 陈飞,蒋孟军,朱宝.新型双功能螯合剂 DOTA 及其衍生物在金属核素标记中的应用进展 [J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2016, 36 (4): 371-374. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2016.04.023.
Chen F, Jiang MJ, Zhu B. Application of new bifunctional chelator DOTA and its derivatives in the metal radionuclide labeled compounds [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2016, 36 (4): 371-374. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2016.04.023.
- [5] Ognjanović M, Radović M, Mirković M, et al. ^{99m}Tc-, ⁹⁰Y-, and ¹⁷⁷Lu-labeled iron oxide nanoflowers designed for potential use in dual magnetic hyperthermia/radionuclide cancer therapy and diagnosis [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11 (44): 41109-41117. DOI:10.1021/acsami.9b16428.
- [6] Pouget JP, Lozza C, Deshayes E, et al. Introduction to radiobiology of targeted radionuclide therapy [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, 2: 12. DOI:10.3389/fmed.2015.00012.
- [7] Stéen E, Edem PE, Nørregaard K, et al. Pretargeting in nuclear imaging and radionuclide therapy: improving efficacy of theranostics and nanomedicines [J]. *Biomaterials*, 2018, 179: 209-245. DOI:10.1016/j.biomaterials.2018.06.021.
- [8] 尚文婷,田捷.纳米探针在肿瘤诊疗中的研究进展 [J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2017, 37 (11): 726-729. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.11.014.
Shang WT, Tian J. Progress of nanoprobes for cancer diagnosis and treatment [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2017, 37 (11): 726-729. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.11.014.
- [9] Liu J, Detrembleur C, De Pauw-Gillet M-C, et al. Gold nanorods coated with mesoporous silica shell as drug delivery system for remote near infrared light-activated release and potential phototherapy [J]. *Small*, 2015, 11 (19): 2323-2332. DOI: 10.1002/smll.201402145.
- [10] Srinivas US, Tan B, Vellayappan BA, et al. ROS and the DNA damage response in cancer [J]. *Redox Biol*, 2019, 25: 101084. DOI:10.1016/j.redox.2018.101084.
- [11] An J, Hu YG, Cheng K, et al. ROS-augmented and tumor-micro-environment responsive biodegradable nanoplatfor for enhancing chemo-sonodynamic therapy [J]. *Biomaterials*, 2020, 234: 119761. DOI:10.1016/j.biomaterials.2020.119761.

(收稿日期:2022-02-10)