

• 实验研究 •

携载 Ce6 核壳纳米粒的双模态成像及光热治疗研究

卢佳慧, 朱熹, 黄天濠, 刘雅文, 倪晨, 庄银苹, 时梅林, 胡俊峰

【摘要】 目的: 构建介孔二氧化硅(MSN)-聚多巴胺(PDA)核壳纳米粒子(MSN-Ce6@PDA-Gd nanoparticles, MSN-Ce6@PDA-Gd NPs), 探讨其应用于体内外磁共振成像及荧光成像的潜能和光热治疗效用。**方法:** 采用十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)模板法、甲苯回流法制备氨基化介孔二氧化硅(MSN-NH₂)纳米粒子, 并通过静电作用包裹二氢卟吩 e6(Ce6), 最后采用溶液氧化法进行 PDA 涂覆及钆离子(Gd³⁺)配位后, 制备获得 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs。采用透射电子显微镜(TEM)、Zeta 电位、紫外光谱等方法对 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 进行表征。采用红外热成像仪监测光热升温效果。采用细胞增殖及细胞毒性检测(MTT)法分析此纳米材料对小鼠胚胎成纤维细胞 NIH-3T3 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的细胞毒性及光热杀伤 231 细胞的效果。采用 3.0T 磁共振扫描仪观察此纳米诊疗剂的体内代谢途径及治疗前、后肿瘤大小, 采用倒置荧光显微镜及荧光成像系统观察其体内外荧光成像效果。采用单因素方差分析进行数据的统计学分析。**结果:** MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 水合粒径为 (142.10±0.29) nm, 电位(-16.03±0.12) mV。Ce6 的最高包封率为 53.58%, 负载量为 17.65%。在不同浓度 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液的作用下 NIH-3T3 和 MDA-MB-231 细胞存活率的差异均无统计学意义($F=2.317, P>0.05; F=2.344, P>0.05$)。体外成像结果显示 MDA-MB-231 细胞内磁共振 T₁ 信号及荧光成像信号的增强具有浓度依赖性。体外光热治疗结果显示, 随着 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 浓度的递增(0.0、12.5、25.0、50.0、100.0、150.0 和 200.0 mg/L), 激光辐照组的 MDA-MB-231 细胞的存活率递减; 无激光辐照组在纳米粒子浓度为 0.0~200.0 mg/L 以及激光辐照组在纳米粒子浓度为 0~50.0 mg/L 时均表现出较高的细胞存活率, 当纳米粒子的浓度为 100.0~200.0 mg/L 时, 激光辐照组的细胞存活率显著降低。在体实验结果表明 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 可以实现对乳腺癌荷瘤裸鼠的双模态成像以及对乳腺癌肿瘤有效的治疗作用。**结论:** 制备了一种新型诊疗材料 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs, 可成功实现对乳腺癌的体内外磁共振/荧光双模态显像和光热治疗。

【关键词】 乳腺肿瘤; 磁共振成像; 光学成像; 二氢卟吩 e6; 介孔二氧化硅; 聚多巴胺; 光热治疗

【中图分类号】 R445.2; R739.41 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2021)12-1453-09

DOI:10.13609/j.cnki.1000-0313.2021.12.001

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Dual mode imaging and photothermal treatment of Ce6 loaded core-shell nanoparticles LU Jia-hui, ZHU Xi, HUANG Tian-hao, et al. School of Medical Imaging, Xuzhou Medical University, Jiangsu 221004, China

【Abstract】 Objective: To construct a mesoporous silicon (MSN)-polydopamine (PDA) core-shell theranostic nanoparticles (MSN-Ce6@PDA-Gd NPs), and to investigate its potential application in magnetic resonance imaging, fluorescence imaging and photothermal treatment effect in vitro and in vivo. **Methods:** The amino mesoporous silicon (MSN-NH₂) nanoparticles were prepared by cetyltrimethylammoniumchloride (CTAC) template method and toluene reflux-method. The nanoparticle was coated with Chlorin e6 (Ce6) by electrostatic effect, and finally the solution oxidation method was used for PDA coating and the coordination of Gadolinium ion (Gd³⁺). TEM, Zeta potential and UV-vis spectra were used to characterize MSN-Ce6@PDA-Gd NPs. The effect of photothermal heating was

作者单位: 221004 江苏徐州, 徐州医科大学医学影像学院(卢佳慧, 黄天濠, 刘雅文, 倪晨, 庄银苹, 时梅林, 胡俊峰); 310000 杭州, 杭州医学院医学影像学院(卢佳慧); 225000 江苏扬州, 扬州大学临床医学院(朱熹)

作者简介: 卢佳慧(1994—), 女, 江西九江人, 硕士研究生, 技师, 主要从事纳米医学与分子影像研究工作。

通讯作者: 胡俊峰, E-mail: hjf098@xzhmu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81602533); 江苏省高校自然科学基金计划项目(16KJB310019); 徐州市科技创新专项项目(KC16SY153); 教育部产学研合作协同育人项目(201801226011); 江苏省教育科学十三五规划课题(D-2020-01-29); 江苏省高等教育学会评估委员会立项课题(2020-C24); 江苏省高校“青蓝工程”; 江苏省研究生科研与实践创新计划资助项目(KYCX20-2466); 浙江省高校基本科研经费专项资助(KYQN202103)。

monitored by infrared thermal imager. One-way analysis of variance was used to process the data. Cell proliferation and cytotoxicity test (MTT) was used to detect the cytotoxicity of NIH-3T3 mouse embryonic fibroblasts and MDA-MB-231 human breast cancer cells as well as the photothermal killing effect on MDA-MB-231 cells. In vitro and in vivo MRI, in vivo metabolic pathway and tumor size before and after treatment were observed using a 3.0T MR scanner. In vitro and in vivo fluorescence imaging effects were observed with inverted fluorescence microscope and fluorescence imaging system. **Results:** MSN-Ce6@PDA-Gd NPs hydration particle size was (142.10 ± 0.29) nm, potential (-16.03 ± 0.12) mV. The maximum encapsulation rate of Ce6 was 53.58% and the loading capacity was 17.65%. There was no significant difference in survival rate between 3T3 and 231 cells under different concentrations of MSN-Ce6@PDA-Gd NPs ($F=2.317$ and 2.344 , $P>0.05$ for both). In vitro imaging experiment results showed that the enhancement of MRI T_1 -signal intensity and fluorescence imaging signal intensity in MDA-MB-231 cells was concentration-dependent. The results of in vitro photothermal therapy showed that the survival rate of MDA-MB-231 cells in the laser irradiation group decreased with the increasing mass concentration of MSN-Ce6@PDA-Gd NPs (0.0, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 150.0 and 200.0 mg/L). High cell survival rates were observed in both the non-laser irradiation group (0.0~200.0 mg/L) and the laser irradiation group (0.0~50.0 mg/L). When the mass concentration was in the range of 100.0~200.0 mg/L, the cell survival rate of the laser irradiation group decreased significantly. In vivo experiments showed that MSN-Ce6@PDA-Gd NPs could achieve dual-modal imaging of breast cancer in nude mice and can effectively control the growth of breast cancer tumors. **Conclusion:** A novel theranostic nanoparticle MSN-Ce6@PDA-Gd NPs has been prepared, which can successfully achieve in vitro and in vivo magnetic resonance fluorescence bimodal imaging and photothermal therapy for breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Magnetic resonance imaging; Optical imaging; Chlorin e6; Mesoporous silica; Polydopamine; Photothermal treatment

乳腺癌是女性最常见且致死率高的恶性肿瘤之一,发病具有年轻化的趋势,起病隐匿的特征使得部分患者确诊时已是癌症中晚期,错过了最佳的手术保乳时机。为了更好地控制病情的进展,早期诊断和及时治疗对乳腺癌患者具有重要的临床意义^[1,2]。分子影像对病变的检测具有极高的敏感性,可在分子或细胞层面检测到肿瘤的发生和发展。目前,能否构建出新型分子探针,实现在细胞层面上对乳腺癌发生发展的可视化检测,并对早期治疗进行指导,是当前分子影像学在乳腺癌的诊疗中亟待解决的热点问题^[3]。活体MRI不受组织深度的影响,可以较好地观察组织器官的内部结构,适用于绝大多数肿瘤的成像。活体荧光成像由于荧光穿透深度有限,主要应用于表浅性肿瘤的成像。光热治疗则是凭借光热转换剂可在近红外激光下吸收能量并转换为热能的性能,通过提高局部温度来杀伤癌细胞的一种肿瘤治疗策略,具有侵入性小、选择性高以及可控性强的优点^[4]。但其穿透深度不足,因此主要适用于表浅肿瘤(如乳腺癌,黑色素瘤等)的早期治疗。乳腺癌属于表浅性肿瘤,在实现活体荧光成像及光热治疗上具有独特的优势。

本研究拟构建一种新型诊疗纳米粒子-介孔二氧化

化硅(mesoporous silicon, MSN)-聚多巴胺(polydopamine, PDA)核壳纳米粒子(MSN-Ce6@PDA-Gd nanoparticles, MSN-Ce6@PDA-Gd NPs),以实现乳腺癌的分子影像及光热治疗。此新型纳米粒子所借助的核壳纳米载体介孔二氧化硅-聚多巴胺具有生物相容性好、负载能力强的优点,既可稳定递送荧光成像剂二氢卟吩 e6(chlorine e6, Ce6),亦具有能进行磁共振 T_1 WI 的钆离子(Gd),并凭借聚多巴胺具有光吸收和热转换的性能。本研究中对这种新型诊疗纳米粒子在体内、外行磁共振-荧光双模态成像的潜能以及介导光热治疗乳腺癌的效能进行了探讨。

材料与方法

1. 实验材料

主要试剂中十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammoniumchloride, CTAC)、氯化钠、三乙胺、环己烷、正硅酸四乙酯和甲醇,均购于国药集团化学试剂有限公司(中国);二氢卟吩 e6 购于 Frontiersci 公司(美国);盐酸多巴胺购于 Aladdin 公司;3-氨基丙基三乙氧基硅烷和氯化钆($GdCl_3 \cdot 6H_2O$)购于 Sigma-Aldrich 公司(美国)。

试验设备和材料:德国 Sigma 3-30KS 离心机;美国 DMI3000B 透射电子显微镜;英国 Nano ZS90 马尔文粒径分析仪;UH4150 紫外可见分光光度计;德国 Leica 倒置荧光显微镜;美国 Biotek 酶标仪;GE Discovery 750W 3.0T 磁共振仪和 GE AW4.6 后处理工作站;PSU-III 型激光器;美国 Fotric 红外热成像仪;美国 Bio-Rad 荧光成像系统。

实验动物:雌性健康无特定病原体级昆明小鼠 6 只(鼠龄 6 周)以及雌性 BALA/C 裸鼠 6 只(鼠龄 6 周),均购于徐州医科大学动物实验中心。动物实验均严格按照徐州医科大学实验动物伦理道德管理委员会的规定进行。

2. 药物制备和性能检测

氨基化介孔二氧化硅(aminated mesoporous silicon, MSN-NH₂)的制备参考 Dai 等^[5]的方法并进行了改良,具体步骤:(1)将 26 mL 纯水、20 mL 百分比浓度为 25% 的 CTAC 及 250 μ L 三乙胺溶液倒入圆底烧瓶中,置于 70℃ 水浴中反应 1 h,再加入 20 mL 环己烷与正硅酸乙酯的混合液后继续反应 24 h 后,使用百分比浓度为 1% 的氯化钠-无水甲醇溶液进行脱模板,得到介孔二氧化硅。(2)采用甲苯回流法进一步制备氨基化 MSN。称取 150 mg MSN 粉末置于烧瓶中,并加入 10 mL 无水甲苯,待水浴温度达到 70℃ 后,加入 15 μ L 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,在氮气氛围下继续反应 4 h。收集所得混合液进行离心洗涤,并冷冻干燥以备用。

MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的制备:将 1.0 mL Ce6 溶液(3.0 g/L)分别加入不同质量(3.0、4.5、6.0、7.5 和 9.0 mg)的 MSN-NH₂ 中,室温下搅拌一夜,所得混合液进行充分的离心洗涤,直至上清液接近无色,再向沉淀中加入 2.5 mL 盐酸多巴胺溶液(10.0 g/L, Tris-HCl 缓冲液)搅拌 6 h,随后加入 2.5 mL GdCl₃ · 6H₂O 溶液(10.0 g/L)继续搅拌 4 h。最后将此混合液进行 3 次高速离心洗涤(离心半径 65 mm, 20 min, 14100 rpm),即可得到 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs。全程避光操作。

使用透射电子显微镜及 Nano ZS90 仪器测量所制备纳米材料的形貌、粒径和表面电位;使用紫外可见分光光度计检测 MSN 与 Ce6 不同配比的上清液的吸收光谱,以计算 Ce6 的包封率和负载量;使用荧光发射光谱检验所制备 MSN-Ce6 的荧光强度;使用红外热成像仪监测 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 在 808nm 激光照射下的升温情况;使用酶标仪检测各种处理下 MSN 的吸光度。

3. 细胞毒性实验

采用细胞增殖及细胞毒性检测(cell proliferation

and cytotoxicity test, MTT) 分析此纳米诊疗剂对小鼠胚胎成纤维细胞(NIH-3T3)和人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)活性的影响。以 5×10^3 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板,培养至细胞生长面积达到 80% 左右,然后分别加入含不同浓度(0.0、12.5、25.0、50.0、100.0、150.0 和 200.0 mg/L) MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液的新鲜培养基(每组设置 6 个复孔,使每孔最终体积为 100 μ L)孵育 24 h。使用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 3 遍后,每孔加入 100 μ L 新鲜培养液以及 20 μ L 噻唑蓝 MTT 溶液(5.0 g/L),孵育 4 h 后弃上清。每孔再加入 100 μ L 二甲亚砷溶液,并放入恒温摇床振荡 15 min。最后使用多功能酶标仪检测 490 nm 波长处各孔的吸光度,并计算相对细胞存活率。

4. MRI 和荧光成像性能离体检测

MRI 性能检测:配置含不同 Gd 浓度(0、0.0106、0.0408、0.3260、0.4091、0.5168 和 0.9438 mmol/L)的 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 水溶液,每种浓度的溶液各取 500 μ L 注于 0.5 mL 的离心管中,以纯水为对照组,使用 3.0T MR 扫描仪进行扫描,通过采集 T₁ 弛豫时间并计算 T₁ 弛豫率,来观察其 MRI 性能。为进一步检测此纳米材料与细胞结合后的 T₁ WI 效果,将人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 以 1×10^5 个细胞/孔的种植密度接种于 6 孔板内,然后放于 37℃ 细胞培养箱中进行培养,待细胞生长面积达到 80% 左右,弃去培养基并对 6 孔板内的细胞使用 PBS 洗涤两次,然后吸出 PBS,再向 6 孔板内分别加入 2 mL 不同浓度 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液(0.0、50.0、100.0 和 200.0 mg/L)与细胞孵育 3 h,对照组加入相同体积的 PBS 与细胞孵育 3 h。使用胰酶将贴壁的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 进行消化,并将得到的悬浮细胞收集至离心管内,经离心(离心半径 76 cm, 5 min, 3000 rpm)后使细胞沉积于管底,经细胞摄入的 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 也会沉入管底,向每个离心管内加入等体积的 PBS 后行 MRI 冠状面扫描。扫描参数:TR 425 ms, TE 14.0 ms;视野 18 cm × 18 cm,层厚 3.0 cm。

荧光成像性能检测:以 4×10^4 个细胞/孔的密度接种在 6 孔板的盖玻片上,过夜孵育使细胞贴壁,随后向含有细胞的 6 孔板内分别加入含不同 Ce6 浓度 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs(0、4、8、16 mg/L)的培养基,并共同孵育 4h。依次进行 PBS 漂洗、4% 多聚甲醛固定细胞、细胞核染料 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染以及再次 PBS 漂洗等步骤。最后使用倒置荧光显微镜进行成像(× 20)。Ce6 的激发波长为 400 nm,发射波长为 665 nm, DAPI 的激发波长为 358 nm,发射波长为 461 nm。

5. 光热性能和光热治疗效果检测

配置不同浓度 (0.0、50.0、100.0、150.0 和 200.0 mg/L) 的 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液, 吸取 1.0 mL 于石英比色皿中, 使用 808 nm 激光以 1.5 W/cm^2 的强度照射 10 min, 在红外热成像仪监测下每 30 s 记录一次温度值, 并绘制升温曲线。

为了进一步探究此纳米材料对人乳腺癌细胞的光热治疗效果, 以 5×10^3 个细胞/孔的密度接种 MDA-MB-231 细胞于 96 孔板内, 培养至细胞生长面积达到 80% 左右, 向 96 孔板内加入不同浓度 (0.0、12.5、25.0、50.0、100.0、150.0 和 200.0 mg/L) MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液后孵育 4 h。换液后非激光组直接放入恒温培养箱, 激光组采用 808 nm 以 1.5 W/cm^2 的强度照射 3 min 后放入恒温培养箱, 后续步骤同细胞毒性实验。最后, 使用多功能酶标仪检测 490 nm 波长处各孔的吸光度, 计算相对细胞存活率以评估光热治疗 (photothermal therapy, PTT) 的疗效。

6. 体内生物相容性分析

选取雌性健康无特定病原体级的昆明小鼠 6 只, 鼠龄 6 周, 体质量 (32 ± 2) g。对照组 ($n=3$) 不进行处理, 实验组 ($n=3$) 注射 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液。根据昆明小鼠血容量为体重的 6%~7% 计算, 其血容量约为 2.0 mL。为保证纳米材料在小鼠血液循环中能保持 200 mg/L 的浓度, 因此经昆明小鼠尾静脉注射 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的剂量为 20 mg/kg。在注射后第 21 天经解剖获得小鼠的心、肝、脾、肺和肾脏标本, 经过固定后使用苏木精-伊红染色法制作病理切片, 在显微镜下观察各器官的组织结构。

7. 体内代谢途径及半衰期

将 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs (20 mg/kg, 200 μL) 经尾静脉注射入 3 只乳腺癌荷瘤裸鼠体内, 在注射后的不同时间点 (0、2、6 和 12 h) 采集裸鼠的全身磁共振图像, 观察此纳米材料的代谢途径。MRI 检查扫描参数: 冠状面 GRE T_1 WI, TR 11.2 ms, TE 3 ms, TI 28.0 ms, 层厚 1.0 mm, 层间距 0.5 mm。此外, 在注射后不同时间点 (0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00 和 12.00 h) 对荷瘤裸鼠经尾静脉取血, 将血液与浓硝酸以体积比 1/10 的比例进行充分混合, 采用电感耦合等离子体质谱仪检测的方法 ICP-MS 法对血液样品中钆离子的含量进行检测, 计算 Gd 在体内的半衰期。

8. 在体 MRI 及荧光成像性能

将人乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 悬液注射到 BALB/C 雌性裸鼠的右侧腋背部皮下软组织内, 待乳腺癌皮下移植瘤长出, 即成功建立荷瘤裸鼠模型。取生长状态良好、肿瘤大小接近的两只荷瘤裸鼠。在注

射 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs (剂量 20 mg/kg) 前、后的四个时间点 (0) 分别对荷瘤裸鼠的肿瘤区域进行 MRI 和荧光成像, 观察肿瘤的成像情况。MRI 扫描参数: 冠状面 GRE T_1 WI, TR 11.2 ms, TE 3 ms, TI 28.0 ms, 层厚 1.0 mm, 层间距 0.5 mm。荧光成像时每帧图片的曝光时间为白光 50 ms、绿光 150 ms。

9. 在体光热治疗效能

将建立成功 (荷瘤裸鼠腋下肿瘤生长至直径约 5 mm) 的 6 只荷瘤裸鼠模型随机分为 2 组, 每组 3 个样本。对实验组和对照组荷瘤裸鼠分别经尾静脉注射 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs (20 mg/kg) 和 200 μL 生理盐水。待肿瘤体积达到 50 mm^3 时对实验组荷瘤裸鼠进行治疗。经尾静脉注射 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 后 2 h 进行激光照射 (波长 808 nm, 强度 1.5 W/cm^2 , 时间 10 min), 每三天治疗一次, 治疗期为两周, 在治疗前和治疗结束后两个时间点使用相机和磁共振扫描仪进行检查。对照组的荷瘤裸鼠不进行治疗。

10. 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 两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 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 理化性能表征

透射电镜图显示 MSN-NH₂ 具有明显的介孔结构, 且孔径和大小均一。MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 亦呈圆形, 介孔结构模糊, 表面较为光滑 (图 1a), 提示材料合成成功。Zeta 电位监测结果显示 MSN-NH₂ 的 Zeta 电位值为正值, 而经过制备的 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的 Zeta 电位值已成功变为负值, 测量值为 (-16.03 ± 0.12) mV (图 1b)。经马尔文粒径检测结果, MSN-NH₂ 和 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的水合粒径分别为 (122.03 ± 0.21) 和 (142.10 ± 0.29) nm (图 1c)。根据离心所得上清液的紫外吸收光谱测量结果, 发现 MSN-NH₂ 与 Ce6 的质量比为 2.5 时, Ce6 的包封率 (53.58%) 和负载量 (17.65%) 较好 (图 1d), 因此最终选择该配比制备纳米材料来进行后续的实验。

2. 细胞毒性实验

MTT 实验结果显示, 小鼠胚胎成纤维细胞 NIH-3T3 及人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与不同浓度 (0.0、12.5、25.0、50.0、100.0、150.0 和 200.0 mg/L) 的 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液孵育后, 细胞存活率均在 90% 以上 (图 2), 总体差异均无统计学意义 ($F_{\text{NIH-3T3}} = 2.317$, $P > 0.05$; $F_{\text{MDA-MB-231}} = 2.344$, $P > 0.05$)。

3. MRI 和荧光成像性能

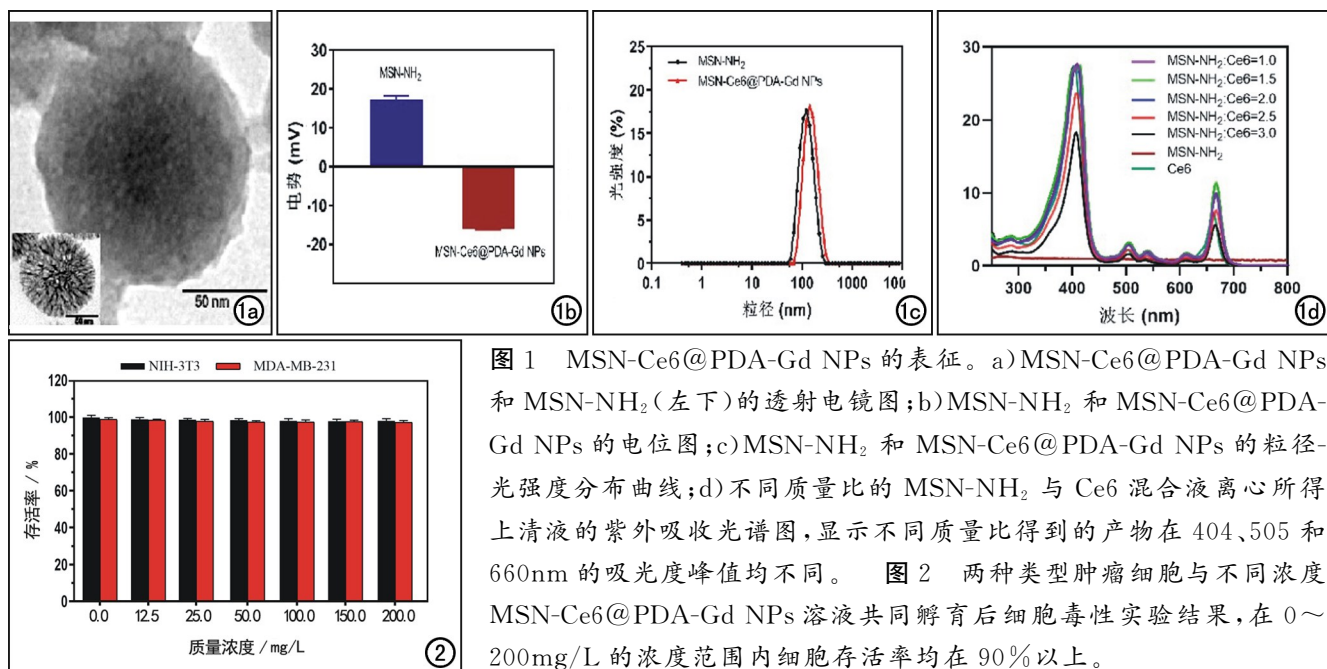


图 1 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的表征。a) MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 和 MSN-NH₂ (左下) 的透射电镜图; b) MSN-NH₂ 和 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的电位图; c) MSN-NH₂ 和 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的粒径-光强度分布曲线; d) 不同质量比的 MSN-NH₂ 与 Ce6 混合液离心所得上清液的紫外吸收光谱图, 显示不同质量比得到的产物在 404、505 和 660 nm 的吸收度峰值均不同。图 2 两种类型肿瘤细胞与不同浓度 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液共同孵育后细胞毒性实验结果, 在 0~200 mg/L 的浓度范围内细胞存活率均在 90% 以上。

MRI 性能检测: 在 MR T₁ WI 上, PBS 对照组在 T₁ WI 上呈低信号; 实验组中, 随着纳米材料中 Gd 浓度的升高 (0、0.0106、0.0408、0.3260、0.4091、0.5168 和 0.9438 mmol/L), 在 T₁ WI 上信号呈逐渐增高的趋势, 在相应的 T₁ 值伪彩图上表现为由绿色逐渐变为蓝色, 提示 T₁ 值逐渐减小 (图 3a); 对应的 T₁ 弛豫时间测量结果依次为 (2115.83±0.60)、(232.24±1.01)、(203.57±0.46)、(175.53±0.46)、(113.97±0.33)、(89.10±0.16) 和 (69.07±0.35) ms。相关性分析结果见图 3b, 显示 Gd 浓度与 T₁ 值的倒数呈良好的线性正相关关系 ($R^2=0.9984$)。不同浓度的纳米诊疗剂与人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 结合后经离心而沉积于 EP 管底部, 在冠状面 T₁ WI 上可见随着纳米诊疗剂浓度的增加 (0~200 mg/L), 离心管底部的信号强度逐渐增高, 在 T₁-rainbow 伪彩图上离心管底部的颜色由蓝

色过度到绿色、最后至红色 (图 3c), 表明沉积细胞的 T₁ 值逐渐减小。结果表明 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 具有良好的 T₁ 加权成像能力。

荧光成像性能表征: 采用倒置荧光显微镜观察 MDA-MB-231 细胞与纳米诊疗剂的结合情况, 由于 DAPI 是一种能与 DNA 强力结合的荧光染料, 与细胞中的 DNA 结合后显示为蓝色荧光, 因此 DAPI 通道中显示的蓝色荧光为细胞核区域; 由于 Ce6 的可在荧光激发下显示为红色荧光, 因此 Ce6 通道中显示的红色荧光反映了 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 在细胞内的分布; Merge 通道中显示的是蓝色荧光和红色荧光的融合, 可观察 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 在细胞内的分布情况。本研究中发现 PBS 组中仅观察到蓝色荧光, 无红色荧光; 以 PBS 为对照组, 将细胞悬液加入含不同 Ce6 浓度 (4、8 和 16 mg/L) 的 MSN-Ce6@PDA-Gd

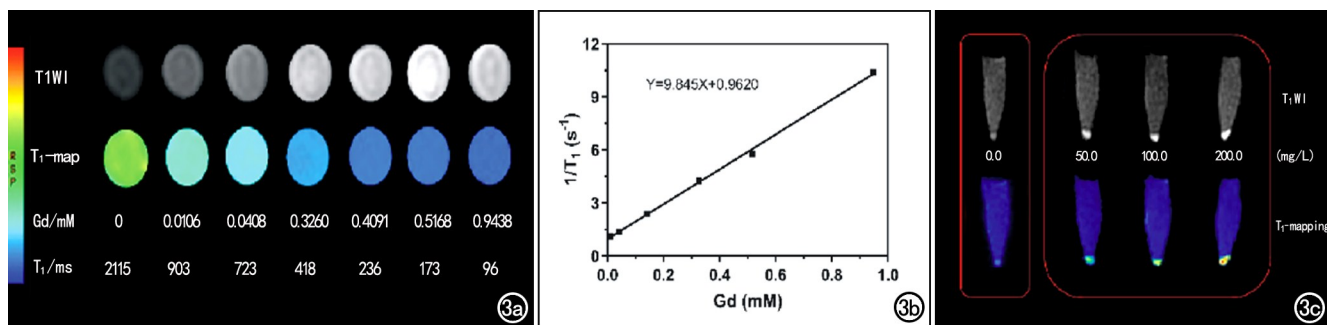


图 3 MRI 性能检测结果。a) 不同 Gd 浓度 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的 MR T₁ WI 图像及 T₁-mapping 伪彩图; b) Gd 浓度与 1/T₁ 值的相关性分析点线图, 显示两者间呈良好的线性相关关系; c) 不同浓度 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液与 MDA-MB-231 细胞孵育后置入离心管内后的 T₁ WI 图像及 T₁-rainbow 伪彩图, 显示随着纳米材料的浓度增加, 在 T₁ WI 上信号强度逐渐增加, 而 T₁ 值逐渐减小 (在 T₁-rainbow 伪彩图上的颜色依次为蓝色-绿色-红色)。

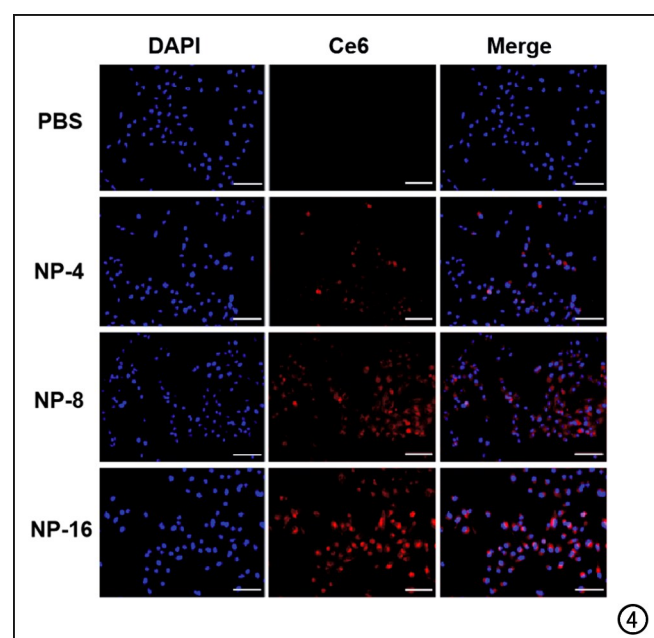


图4 倒置荧光显微镜检测 MDA-MB-231 细胞对纳米诊疗剂的摄取情况(标尺长度代表 100nm,×20)。含有 PBS 溶液及含有不同 Ce6 浓度(4、8、16mg/L) MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液的培养基与人乳腺癌细胞(MDA-MB-231 细胞)共同孵育后,荧光显微镜下 DAPI 通道可见细胞核区域呈蓝色荧光;Ce6 通道可观察到,相较于对照组(PBS 组),实验组随着 Ce6 浓度浓度的增加(NP-4、NP-8 和 NP-16),红色荧光的亮度逐渐增强;Merge 通道可见红色与蓝色区域不重叠,表明 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 不进入细胞核。

NPs 溶液(依次简称为 NP-4、NP-8 和 NP-16 组)的培养基中孵育 4 h 后,细胞悬液中则观察到明显的红色荧光,且随着 Ce6 浓度的增加在显微镜图像上的荧光亮度逐渐提高(图 4)。使用 Image J 软件进行单个细胞平均荧光强度的半定量分析,结果显示 NP-4、NP-8 和 NP-16 这 3 组的单个细胞平均荧光强度值分别为 54.47 ± 1.14 、 65.35 ± 0.99 和 103.87 ± 1.07 ,3 组间的差异有统计学意义($F = 4298.203, P < 0.001$);NP-4 和 NP-8 组分别与 NP-16 组比较,差异均有统计学意义($t = 44.679, P < 0.001; t = 37.294, P < 0.001$)。上述结果表明人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)对 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的摄入具有浓度依赖性,当其内 Ce6 的浓度为 16 mg/L 时乳腺癌细胞具有较好的荧光显像效果。

4. 光热性能和光热治疗效果

本实验结果显示,随着激光照射时间的增加,MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶

液的温度逐渐升高并趋于平衡(图 5a)。在 808 nm 激光辐照(1.5 W/cm^2 , 10 min)后,150 mg/L 组溶液温度可达到 43.7°C ,200 mg/L 组溶液温度可高达 51.5°C 。细胞光热治疗作用的实验结果显示:在激光辐照组中,当纳米材料的浓度为 0.0、12.5、25.0、50.0、100.0、150.0 和 200.0 mg/L 时,细胞存活率分别为 $100.83\% \pm 4.68\%$ 、 $95.51\% \pm 2.30\%$ 、 $92.07\% \pm 1.15\%$ 、 $89.18\% \pm 1.08\%$ 、 $68.74\% \pm 0.57\%$ 、 $43.83\% \pm 2.22\%$ 和 $23.07\% \pm 1.41\%$,总体差异有统计学意义($F = 793.216, P < 0.001$)。无激光辐照组中各浓度(0~200 mg/L)的纳米材料以及激光辐照组中纳米材料的浓度为 0~50 mg/L 时,细胞存活率较高;而在激光辐照组中当纳米材料的浓度达 100~200 mg/L 时,细胞存活率显著降低(图 5b)。

5. 纳米材料在体内的生物相容性

21 天后的苏木精-伊红染色后的组织切片结果显示,与空白对照组比较,MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 组的昆明小鼠体内脏器(心、肝、肾脏、肺和脾)无明显异常(图 6)。表明该核壳纳米诊疗剂具有良好的体内生物相容性。

6. 体内代谢途径及半衰期

荷瘤裸鼠在注射 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 后,增强早期在 MR T_1 WI 上即可见肝脏有较明显强化,随着时间推移,强化程度逐渐减低,12 h 后肝脏信号强度恢复至注射前(图 7)。提示 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 通过肝脏进行排泄。此外,以荷瘤裸鼠注射 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 后的取血时间为横坐标,以电感耦合等离子体质谱仪测得的血液样品中的 Gd 浓度为纵坐标进行绘图及计算,获得其代谢曲线(图 8),结果显示此纳米材料中 Gd 的血液半衰期约为 2.03 h。

7. 在体磁共振及荧光成像性能

在获得较好的体外成像效果后,我们进一步评估了 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 活体成像效果。荷瘤裸

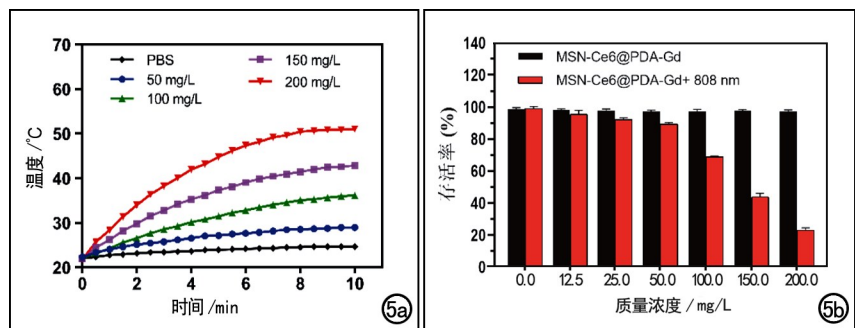


图5 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的光热效能。a)PBS 溶液以及不同浓度 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液在激光照射下(808 nm, 1.5 W/cm^2 , 10 min)的升温曲线;b)不同浓度 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液在有或无激光处理后的细胞存活率条形图。

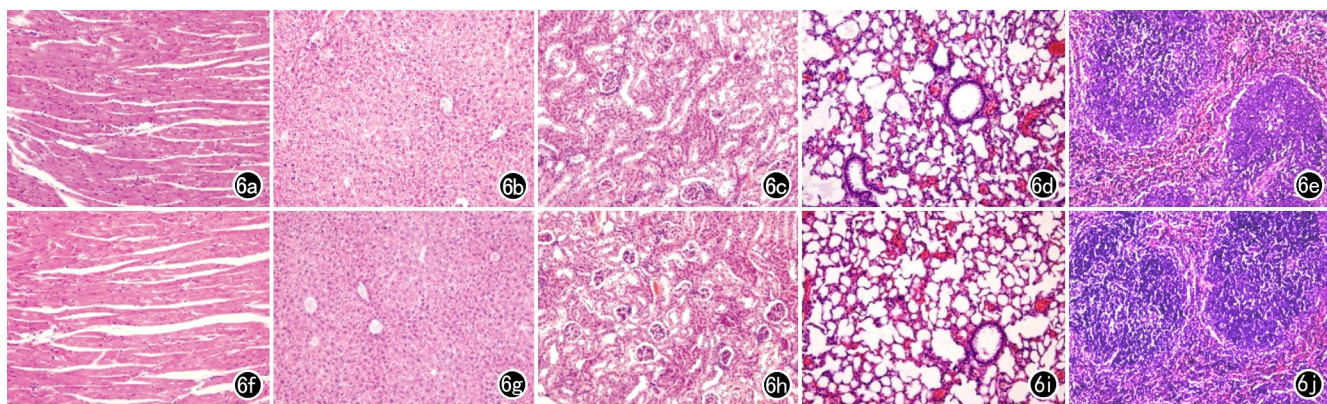


图 6 各脏器的组织病理图($\times 400$, HE)。图 a~e 依次为对照组中小鼠的心、肝、肾脏、肺和脾脏标本的病理图,图 f~j 依次为实验组在注射 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液 21 天时小鼠的心、肝、肾脏、肺和脾脏标本的病理图。两组小鼠的心肌组织均显示肌纤维正常分布,细胞横纹清晰,间质细胞正常,胞核完整,无炎症细胞浸润现象;两组小鼠的肝脏组织均显示肝细胞索间界清晰,胞浆界限明显,肝细胞以中央静脉为中心向周围放射状排列;两组小鼠的肾脏组织均显示胞核完整,细胞核清晰可见,胞质和胞浆对比鲜明;两组小鼠的脾脏细胞结构均显示清晰,红髓和白髓界限较明显。

鼠的在体 MRI 和荧光成像检查显示,注射此纳米诊疗剂后肿瘤区域有明显强化(图 9a)和明显的荧光强化(图 9b)。在体成像结果表明 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 可实现对乳腺癌病灶的在体 MR 和荧光双模态成像。

8. 在体光热治疗效能

在治疗前及激光辐照治疗两周后进行在体光热治疗效能的评估。裸鼠照片及 MR 图像显示,对照组中裸鼠皮下的肿瘤组织明显大于未治疗时(图 10a);而注射 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 结合 808 nm 激光组裸鼠的肿瘤在治疗后小于治疗前的大小,且该组瘤体的大小明显小于对照组(图 10b)。本组结果表明了 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs+808 nm 激光能实现有效的乳腺癌在体光热治疗。

讨 论

分子影像中 MRI 和荧光成像双模态成像技术兼具 MRI 的空间分辨率高、不受组织深度影响以及荧光成像的时间分辨率高、可实时成像的优点,可作为乳腺癌早期诊断的有效手段^[6-7]。第二代光敏剂二氢卟吩 e6(chlorine e6, Ce6)具有光稳定性好,成像性能佳的优点,其激发光为红色荧光,可有效区别生物体的黄绿色背景荧光,是一种性能优异的荧光成像剂^[8]。但强疏水性使 Ce6 易发生团聚,进而将显著影响其在肿瘤细胞中的摄取^[9]。本研究采用负载潜能高的介孔二氧化硅为载体,并与亲水性能良好的聚多巴胺涂层联合使用,以提高对疏水性光敏剂 Ce6 的负载性能。值得一提的是,本研究所使用的聚多巴胺涂层,是金属离

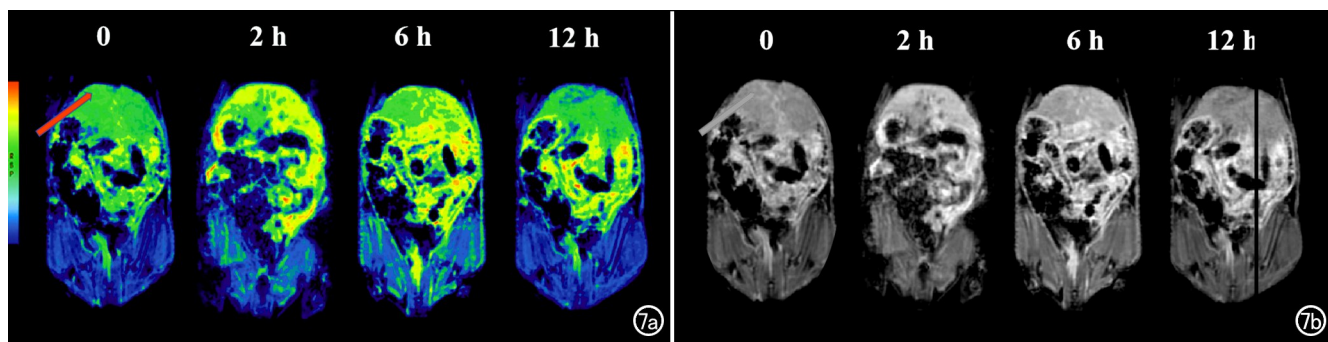


图 7 荷瘤裸鼠在注射 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液前、后 4 个时间点的 MRI 图像。a) T_1 -rainbow 伪彩图显示肝脏(箭)在 0 h 时呈绿色。注射后 2 h 黄色区域增加,6 h 时黄色区域较前减少,12 h 时恢复至绿色,由于 rainbow 伪彩图上的颜色蓝色-绿色-黄色-红色代表 T_1 值逐渐由高到低,因此结果表明肝脏区域的 T_1 值先减小,6 h 后增加,再至 12 h 恢复至接近初始水平;b) T_1 WI 显示注射后 2 h 肝脏区域的信号强度增高,6 h 时肝脏的信号强度减弱,在 12 h 时肝脏的信号强度恢复至与 0 h 时接近。

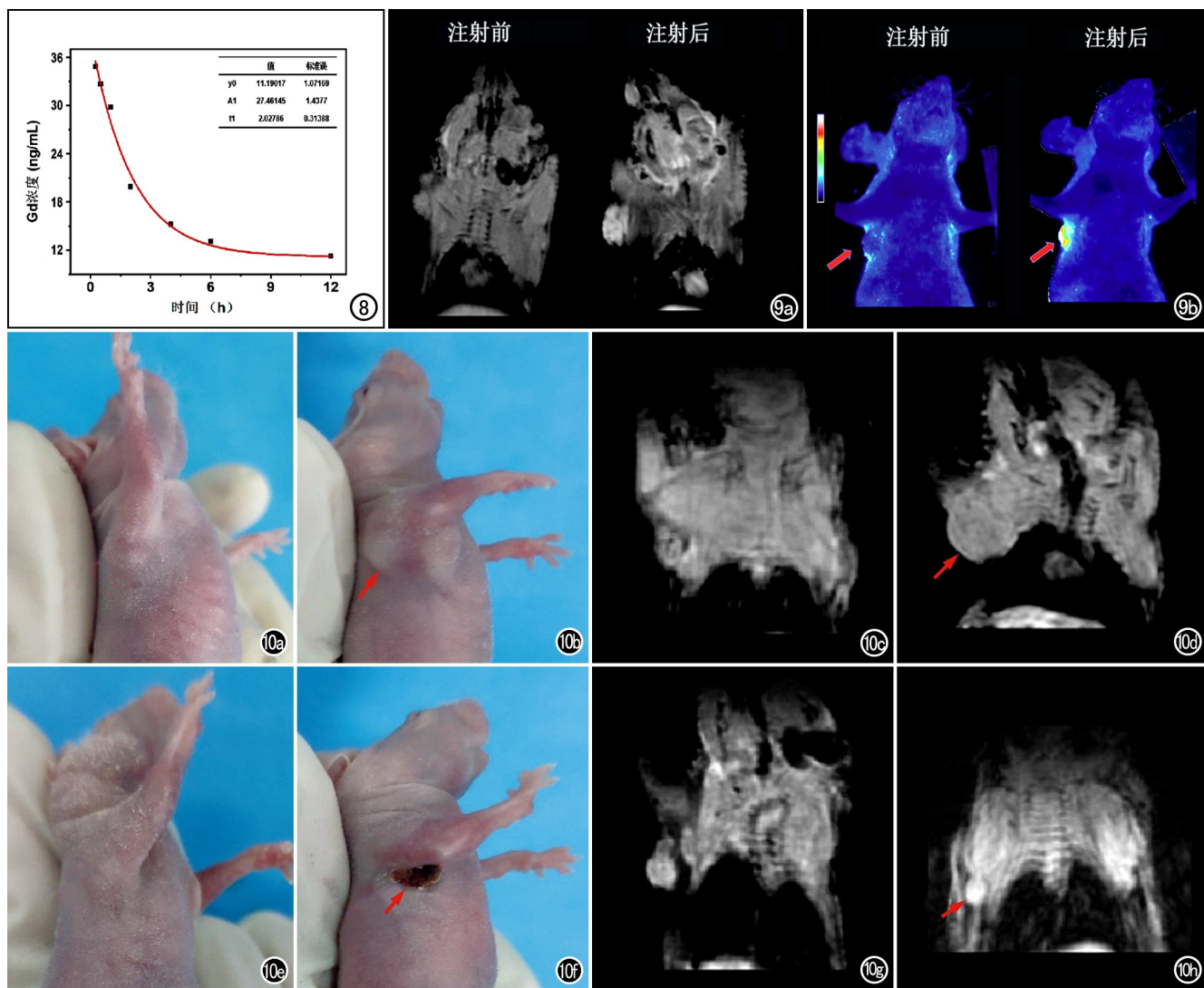


图 8 血液内 Gd 离子浓度-时间曲线, Gd 离子浓度在体内的半衰期为 2.03 ± 0.31 。图 9 荷瘤裸鼠在体 MRI 及荧光成像。a) MR T₁ WI 显示注射纳米诊疗剂后肿瘤组织有明显强化(箭); b) 荧光成像图(显示注射纳米诊疗剂后肿瘤组织有明显荧光强化(箭))。图 10 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的光热治疗性能检测。图 a~d 为对照组(注射生理盐水)图像, 图 e~h 为实验组(注射 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs)图像。a) 治疗前对照组裸鼠照片; b) 激光辐照治疗结束后对照组裸鼠照片, 显示皮下肿瘤(箭)较前明显增大; c) 治疗前对照组裸鼠 MR T₁ WI; d) 激光辐照治疗后对照组裸鼠 T₁ WI, 显示肿瘤(箭)较治疗前明显增大; e) 治疗前实验组裸鼠照片; f) 治疗后实验组裸鼠照片, 显示皮下肿瘤(箭)较前明显减小; g) 治疗前实验组裸鼠 MR T₁ WI; h) 激光辐照治疗后实验组裸鼠 T₁ WI, 显示瘤体(箭)较前明显减小。

子(如钆离子、锰离子和铁离子)的强配位体, 故具有成为 MRI 对比剂的潜能^[10], 还具备近红外光吸收和光热转换能力, 是一种有效的光热治疗剂。因此, 本研究中所构建出的多功能纳米体系可具有磁共振和荧光成像能力及光热治疗效能。

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 属于高转移性恶性乳腺癌细胞系, 呈贴壁生长, 其形态为上皮细胞样, 是研究乳腺癌转移的经典模型细胞系^[11]。因此, 本研究中使用该细胞系用于后续的研究。细胞毒性结果显示, 当 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的浓度为 0 ~

200 mg/L 时, 小鼠胚胎成纤维细胞 NIH-3T3 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的相对存活率均维持在 90% 以上。相较于 Dong 等^[12]制备的锰配位聚多巴胺溶液的细胞存活浓度范围(0~80 mg/L), 以及 Yang 等^[13]制备的介孔硅装载二氢卟吩 e6 的细胞存活浓度范围(0~200 mg/L), 本研究中制备的 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的细胞毒性较低。此外, 与空白对照组比较, 此纳米材料经昆明小鼠尾静脉注射后 21 天的病理切片可观察到, 所有被检器官均无明显的器质性病变、炎症和其它异常。

本次研究中对 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的磁共振成像和荧光成像性能进行了分析,结果显示此纳米材料在体外具有明显的磁共振成像效果,纵向弛豫率为 $9.845 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$,是临床上常规使用的 MRI 对比剂钆喷酸葡胺的纵向弛豫率 ($4.49 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 的 2.36 倍^[14]。在细胞层面,未经此纳米材料处理的肿瘤细胞未见明显增强表现,而随着与肿瘤细胞共同孵育的 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液的浓度逐渐增高 (50.0、100.0 和 200.0 mg/L),肿瘤细胞沉积物在磁共振 T₁WI 上信号强度逐渐增高。为了解较低浓度的纳米诊疗剂可否实现细胞荧光成像,我们在研究中将含有不同 Ce6 浓度 (0、4、8 和 16 mg/L) 的 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液与人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 一起孵育,发现随着浓度的增加,孵育细胞表现出逐渐增强的红色荧光,16 mg/mL 浓度组的细胞荧光强度可实现较好的荧光成像效果。根据负载量计算,Ce6 的浓度为 4、8 和 16 mg/L 时对应的 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 的浓度分别为 22.66、45.33 和 90.65 mg/L。由此可见,浓度为 90.65 mg/L 的 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液对乳腺癌细胞即可具有良好的荧光成像能力。对乳腺癌荷瘤裸鼠的在体 MRI 和荧光成像结果显示,MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 可实现对乳腺癌的双模态成像。此外,MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 中的 Gd 离子在荷瘤裸鼠血液内的半衰期约为 2.03 h,与临床常用的磁共振对比剂钆喷酸葡胺相比,半衰期明显增加,为实现光热治疗作用提供了基础^[15-16]。

本研究中还发现,MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 表现出良好的升温效果。将 1.0 mL 的 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 溶液 (200 mg/L) 经尾静脉注入荷瘤裸鼠体内,注射 2 h 后对肿瘤组织使用 808 nm 激光辐照 (1.5 W/cm^2) 10 min,肿瘤组织的局部温度可升高至 51.5°C ,显著高于光热消融肿瘤的温度标准 (43°C)。此外,经该浓度的纳米材料处理的乳腺癌细胞 MDA-MB-231,相较于无激光辐照组,激光辐照组中的细胞存活率更低。乳腺癌荷瘤裸鼠的在体实验结果也表明 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs 可实现有效的肿瘤治疗效果。

综上所述,本研究成功构建了基于介孔硅-聚多巴胺的核壳结构的纳米诊疗剂 MSN-Ce6@PDA-Gd NPs,其具有磁共振和荧光双模态成像效果及光热治疗乳腺癌的效用,为实现乳腺癌的诊疗提供了新思路。

(利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突)。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA, 2020, 70(1):7-30. DOI:10.3322/caac.21590.
- [2] 张琦,宋富桂,吕哲昊,等.影像组学在预测乳腺癌分子分型中的研

- 究进展[J].放射学实践,2020,35(11):1476-1478.
- [3] Dibble EH, Hunt KN, Ehman EC, et al. Molecular breast imaging in clinical practice[J]. AJR, 2020, 215(2):1-8. DOI:10.2214/AJR.19.22622.
- [4] Zhang D, Wu M, Zeng Y, et al. Chlorin e6 conjugated poly(dopamine) nanospheres as PDT/PTT dual-modal therapeutic agents for enhanced cancer therapy [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(15):8176-8187.
- [5] Dai Y, Zhang A, You J, et al. Fabrication of AS1411 aptamer functionalized Gd₂O₃-based molecular magnetic resonance imaging (mMRI) nanoprobe for renal carcinoma cell imaging[J/OL]. RSC Advances, 2015, 5:e77204-e77210. DOI:10.1039/C5RA17211J
- [6] 林炳权,许乙凯,冯婕. SPIO-PBCA-PEG 纳米微粒的合成及 MR 成像[J].放射学实践,2011,26(11):1140-1143.
- [7] Wang W, Zhang Q, Zhang M, et al. Multifunctional red carbon dots: a theranostic platform for magnetic resonance imaging and fluorescence imaging-guided chemodynamic therapy[J]. Analyst, 2020, 145(10):3592-3597.
- [8] Liu Y, Bhattarai P, Dai Z, et al. Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer[J]. Chem Soc Rev, 2019, 48(7):2053-2108.
- [9] Tan X, Pang X, Lei M, et al. An efficient dual-loaded multifunctional nanocarrier for combined photothermal-photodynamic therapy based on copper sulfide and chlorin e6[J]. Intern J Pharmaceut, 2016, 503(1-2):220-228.
- [10] Lu JH, Cai LL, Dai Y, et al. Polydopamine-based nanoparticles for photothermal therapy/chemotherapy and their synergistic therapy with autophagy inhibitor to promote antitumor treatment[J]. Chem Record, 2021, 21(4):781-796.
- [11] Yang H, Wang B, Wang T, et al. Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis[J/OL]. PLoS One, 2014, 9(10):e109980. DOI:10.1371/journal.pone.0109980.
- [12] Dong Z, Gong H, Gao M, et al. Polydopamine nanoparticles as a versatile molecular loading platform to enable imaging-guided cancer combination therapy[J]. Theranostics, 2016, 6(7):1031-1042.
- [13] Yang L, Wang J, Yang S, et al. Rod-shape MSN@MoS₂ nanoplateform for FL/MSOT/CT imaging-guided photothermal and photodynamic therapy [J]. Theranostics, 2019, 9(14):3992-4005.
- [14] Zheng S, Yu N, Han C, et al. Preparation of gadolinium doped carbon dots for enhanced MR imaging and cell fluorescence labeling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 511(2):207-213.
- [15] Parac-Vogt TN, Kimpe K, Laurent S, et al. Synthesis, characterization, and pharmacokinetic evaluation of a potential MRI contrast agent containing two paramagnetic centers with albumin binding affinity[J]. Chemistry, 2005, 11(10):3077-3086.
- [16] Gale EM, Wey HY, Ramsay I, et al. A manganese-based alternative to gadolinium: contrast-enhanced MR angiography[J]. Radiology, 2018, 286(3):865-872.

(收稿日期:2021-02-05 修回日期:2021-05-20)