· 胸部影像学 ·

C60-IONP-GE11 纳米粒对乳腺癌细胞的体外成像及光动力学研究

符舒琦,涂蓉,刘梦婵,洪雅敏,李韩建,尤晓光

【摘要】目的:构建多功能 MRI 对比剂 C60-IONP-GE11,研究其体外细胞磁共振靶向成像效果及 光动力学治疗效果。方法:免疫荧光染色验证 EGFR 高表达肿瘤细胞株;体外磁共振成像观察靶向组 对比剂 C60-IONP-GE11 和非靶向组对比剂 C60-IONP-RP 的成像效果,普鲁氏蓝染色观察对比剂分布 情况;CCK8 法检测 C60-IONP-GE11 的细胞毒性;光动力学实验设置单纯激光组、C60-IONP-GE11 无 激光组、非靶向对比剂+激光组和实验组靶向对比剂 C60-IONP-GE11+激光组 4 个处理组,相应处理 后 CCK8 测其细胞存活率,活性氧检测实验观察不同组 ROS 产生水平,ImageJ 半定量分析 ROS 荧光 水平。结果:免疫荧光实验结果证实 MD-MBA-231 细胞膜上大量表达 EGFR;C60-IONP-GE11 体外 MRI 靶向实验可见 T₂WI 呈负性强化,且 T₂WI 信号随着靶向对比剂浓度增加而降低,线性回归方程 为 Y=145.898-30.269 * X,R2=0.862;普鲁士蓝染色发现 C60-IONP-GE11 实验组可使 MD-MBA-231 细胞膜区明显蓝染,而非靶向对照组不能;体外毒性实验发现 C60-IONP-GE11 无明显细胞毒性; C60-IONP-GE11 体外光动力学杀伤乳腺癌细胞,细胞存活率仅为(22.79±4.84)%,并可见细胞内大量 活性氧生成,活性氧水平随 C60-IONP-GE11 浓度增加而增多。结论:C60-IONP-GE11 多功能 MR 对 比剂具有体外靶向乳腺癌细胞 MR 成像功能,几乎无毒,外加激光可靶向杀伤肿瘤细胞,同时具有 MRI 成像及 PDT 治疗作用。

【关键词】 富勒烯;氧化铁磁性纳米颗粒;磁共振成像;光化学疗法

【中图分类号】R916.3; R318.08; R453; R445.2 【文献标志码】A

【文章编号】1000-0313(2022)06-0715-08

DOI:10.13609/j.cnki.1000-0313.2022.06.008

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on C60-IONP-GE11 nanoparticles for MRI imaging and photodynamic therapy on breast cancer cells in vitro FU Shu-qi, TU Rong, LIU Meng-chan, et al. Department of Radiology, the First Affilia-ted Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China

[Abstract] Objective: To construct a multifunctional MR contrast agent C60-IONP-GE11 and investigate its MR targeted imaging effect and photodynamic therapy effect in vitro. Methods: Immuno-fluorescence staining was used to confirm the EGFR overexpression tumor cell lines. In vitro MR imaging was used to observe the imaging effect of the targeted group with contrast agent C60-IONP-GE11 and the non-targeted group with contrast agent C60-IONP-RP. And the distribution of the contrast agent was observed by Prussian blue staining. The cytotoxicity of C60-IONP-GE11 was detected by CCK8. Photodynamic experiments were set up in four groups: the laser alone group, C60-IONP-GE11 non-laser group, non-targeted contrast agent + laser group and targeted contrast agent C60-IONP-GE11 + laser group.CCK8 assay was used to evaluate cell survival rate after corresponding treatment, and reactive oxygen species (ROS) production was observed in different groups, which can be semi quantitative analysis by Image J. Results: Immunofluorescence confirmed that EGFR was highly expressed on MD-MBA-231 cell membrane. The in vitro MRI targeting experiment of C60-IONP-GE11 showed that T_2 WI was negatively enhanced, and the T_2 WI signal decreased with the increase of the concentration of targeting contrast agent. The linear regression equation was $Y=145.898-30.269 \times X$,

作者单位:570102 海口,海南医学院第一附属医院放射科(符舒琦、涂蓉、李韩建、尤晓光);570216 海口,海南医学院第二 附属医院(刘梦婵);330006 南昌,江西省中医院(洪雅敏)

作者简介:符舒琦(1995-),女,广东湛江人,硕士研究生,住院医师,主要从事影像医学与核医学研究工作。

通讯作者:尤晓光, E-mail: you_xiaoguang@126.com

基金项目:2019年海南省科技厅省重点研发计划项目(ZDYF2019200);国家自然科学基金项目(81760310);海南医学院科学 培育基金项目(HYYFYPY202014)

R2=0.862. Prussian blue staining found that C60-IONP-GE11 experimental group could make MD-MBA-231 cell membrane area blue staining, while targeted control group could not. In vitro toxicity tests showed that C60-IONP-GE11 had no obvious cytotoxicity.C60-IONP-GE11 photokinetically killed breast cancer cells in vitro, and the cell survival rate was only (22.79 ± 4.84) %. A large number of reactive oxygen species were generated in the cells, and reactive oxygen species increased with the increase of C60-IONP-GE11 concentration.**Conclusion**:C60-IONP-GE11 is a multifunctional contrast agent that can target breast cancer cell for MR imaging in vitro, which is almost non-toxic.External laser can target and kill tumor cells.C60-IONP-GE11 has the effects on both MR imaging and PDT treatment.

(Key words) Fullerenes; Magnetic iron oxide nanoparticles; Magnetic resonance imaging; Photochemotherapy

癌症已成为当前世界威胁人类健康和生命的严重 疾病之一^[1]。如何早期诊断并治疗肿瘤是分子影像学 研究热点之一。磁性氧化铁纳米粒子(iron oxide nanoparticles, IONP)是一种多功能磁性纳米材料, 当其 粒径在 5~100 nm 时具有超顺磁性,可作为磁共振成 像(MRI)、生物催化活性(纳米酶)以及药物递送等多 功能的诊疗工具,IONP 合成相对简单、生物相容性 好,可以对其进行进一步的表面修饰,增加水溶性并偶 连靶向分子,因此可用于肿瘤磁共振显像及治疗[2-3]。 C60(fullerene, 富勒烯) 有着独特的物理化学性质, 是 近年来被广泛用作肿瘤光动力治疗(photodynamic therapy,PDT)的光敏剂^[4-5]。GE11(氨基酸序列 YH-WYGYTPQNVI)是首个对表面生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR) 具有高亲和力 的人工合成小分子多肽^[6]。EGFR 受体高表达于上皮 源性肿瘤细胞,与人类多种癌症的发生发展密切相 关^[7]。PDT 是指通过特定波长的激光照射靶组织使 其产生单线态氧、羟基自由基、过氧化氢等活性氧(reactive oxygen species, ROS)物质^[8]。本研究化学合 成 C60-IONP-GE11 靶向多功能 MRI 对比剂(图 1), 观察其体外对乳腺癌细胞 EGFR 靶点靶向成像及 PDT 治疗作用,为后续体内实验奠定前期实验基础。

材料与方法

1.材料和设备

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 来源于国家实验 细胞资源共享平台; 靶向小肽 GE11(QKYHW-YGYTPQNVIQK)和随机小肽(random peptide, RP) (TQRKGKTHRKPHKTKT)由上海吉尔多肽有限公 司合成。相关试剂和试剂盒:FBS、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS)、0.25%胰酶、Cy3标记 山羊抗兔 IgG(H+L)、增强型 CCK-8 试剂盒、ROS 检 测试剂盒(Beyotime Biotechnology); DMEM 高糖培 养基、青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合液(索莱宝); Annexin-V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(杭州联科生物)。设备采用激光扫描共聚焦显微镜(Olympus FV1000,日本),3.0T MRI 和膝关节线圈(Siemens,德国),多功能酶标仪(SynergyHTX,美国),532 nm 激光器(Oxlasers,上海)。

2.方法

①验证 EGFR 高表达肿瘤细胞株:免疫荧光染 色:取人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)接种于共聚焦培 养皿中(1×10⁵ 个/培养皿),37℃,5% CO2 孵育24 h。 4%的多聚甲醛固定 15 min,PBS 浸洗;加入 500 µL 染 色封闭液封闭 30 min;吸掉封闭液后培养皿内滴加足 量 1:200 稀释的一抗并放入湿盒,4℃孵育过夜后加入 比例为 1:500 稀释的荧光二抗,室温孵育 1 h 后用 PBS 浸洗,加 200 µL DAPI 荧光染料孵育 5 min 进行 核复染,最后吸水纸吸干皿内液体在激光共聚焦显微 镜下观察采集图像。

②体外 MRI 成像实验及普鲁氏蓝染色实验:体外 MRI 扫描:取 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板(1× 10^6 个/孔),将其随机分为两组:C60-IONP-GE11(实 验组)和 C60-IONP-RP(非靶向随机小肽对照组),分 别配备 200 μ L浓度为 25、50、100、200、400 μ g/mL 的 溶液与 MDA-MB-231 共孵育 2 h,弃去培养液,PBS 漂 洗三次,细胞铲收集孔内细胞,加入 2 mL PBS 吹打重 悬后加入等体积的 1%琼脂糖溶液进行 MR 扫描并测 量 T2 值。采用 3.0T MR 扫描仪,并选用膝关节线 圈,T₂ 加权自旋回波成像序列,参数:TR 1000 ms,TE 140 ms,视野(FOV)22 cm×22 cm,层厚 0.6 mm,矩阵 384×384。

普鲁士蓝染色法(铁染色):取 MDA-MB-231 细胞接种于爬片中,随机将其分为两组:C60-IONP-GE11 靶向对比剂(实验组)和 C60-IONP-RP 非靶向对比剂(对照组),加入 1.5 mL 浓度为 200 μ g/mL 的 C60-IONP-GE11 或 C60-IONP-RP 对比剂溶液,置于 37℃,5% CO₂ 培养环境下孵育12h。加入4% 多聚

甲醛固定 15 min,PBS 润洗 3 次。普鲁氏蓝染色试剂 盒,1:1 体积比例混合盐酸与亚铁氰化钾溶液细胞染 色 30 min 后,PBS 充分洗涤 3 次,再加伊红染色液淡 染细胞核 15 min,PBS 润洗 5 s 后脱水透明、树胶封 固。

③细胞毒性实验:将人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 以 5×10³ 个/孔(100 μ L/孔)接种到 96 孔板中,待细 胞充分贴壁分别加入 100 μ L 不同浓度梯度的 C60-IONP-GE11,并按照浓度梯度分为以下 7 组:0 μ g/mL (完全培养基空白对照组)、25 μ g/mL、50 μ g/mL、 100 μ g/mL、200 μ g/mL、400 μ g/mL、800 μ g/mL, 每 个浓度梯度设置无细胞的 C60-IONP-GE11 对比剂对 照孔作为背景值,每个浓度设置 5 个复孔,置于 37℃, 5% CO₂ 培养环境下孵育 24 h;每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,培养箱内孵育 1 h,酶标仪检测细胞在 450 nm 处的吸光度(optical density,OD),按照计算公式:细 胞存活率(%)=(实验孔 OD 值-实验组背景孔 OD 值)/(对照孔 OD 值-对照组背景孔 OD 值)计算细胞 存活率。

④体外光动力实验:CCK8(Cell Counting Kit-8, 细胞计数试剂)检测:将人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 以 5×10³ 个/孔(100 μL/孔) 接种到 96 孔板中,每孔 需间隔1个空白孔以便进行光照,置于37℃,5% CO。 培养环境下孵育使其充分贴壁。实验设置4个分组: ①空白激光组(完全培养基);②C60-IONP-GE11 无激 光组;③C60-IONP-RP+激光组;④C60-IONP-GE11 +激光组。②③④组加入 10 µL 浓度为 200 µg/mL 的 C60-IONP-GE11 或 C60-IONP-RP 对比剂溶液,每 组设置 5 个重复孔,37℃,5% CO2 环境孵育 24 h。光 照:吸出培养基,PBS 轻柔润洗 2 次洗去未结合对比 剂,①③④组暴露于 532 nm,100 mW/cm2 激光下照 射 20 min,再孵育 12 h;随后每孔加入 10 µLCCK8,置 于 37℃,5% CO2 培养箱孵育 1.5 h,用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度,按公式计算细胞存活率,绘制曲 线。

活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测:将人 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 以每皿 1×10⁴ 个接种于共 聚焦培养皿中,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱孵育 24 h, 实验设置 6 个分组:①空白激光组(完全培养基);② C60-IONP-GE11 无激光组;③C60-IONP-RP+激光 组;④ 200 μg/mL C60-IONP-GE11 + 激光组;⑤ 400 µg/mL C60-IONP-GE11+激光组;⑥800 µg/mL C60-IONP-GE11+激光组。按照分组加入对应溶液, 每组加入 50 µL 比例为 1:1000 稀释后的 DCFH-DA 探针,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱孵育 30 min,PBS 洗 涤 3 次以洗去未结合探针;①③④⑤⑥组暴露于 532 nm,100 mW/cm² 激光照射 20 min,共聚焦显微 镜下观察活性氧产生情况,并使用 Image J 软件对荧 光结果进行半定量分析。

3.统计分析

采用 SPSS 22 进行统计学分析,体外细胞光动力 学实验使用 Dunnett-t 检验比较各组间差异,体外毒 性实验和 Image J 半定量分析荧光强度,使用 Tamhane's T_2 检验比较各组间差异。

结 果

1. C60-IONP-GE11 表征

透射电镜(transmission electron microscope, TEM)可见 C60-IONP-GE11 形态呈类球形,大小基本 一致(图 1a),动态光散射(dynamic light scattering, DLS)测得 IONP 的水化直径为(29.4±2.1)nm,C60-IONP-GE11的水化直径为(37.7±3.2)nm(图 1b、d), Zeta 电位显示 IONP 电位为(38.8±0.4)mV, C60-IONP-GE11 电位为(-35.9±0.7)mV(图 1c,d):傅氏 转换红外线光谱分析 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)显示, 羧基富勒烯在 3000 cm⁻¹ 左右形成大而宽的峰,且以 3000 cm⁻¹为中心对称,是 缔合羧基的吸收,1433 cm⁻¹、1191 cm⁻¹、525 cm⁻¹是 C60 的特征峰,578 cm⁻¹是 Fe-O 特征振动峰,多巴胺 修饰的 Fe₃O₄ 在 3400 cm⁻¹、1597 cm⁻¹、1265 cm⁻¹出 现氨基的吸收峰,C60-IONP-GE11 在 3419 cm⁻¹的吸 收峰是 v(-NH2)和 v(-OH)的叠加,在 1733 cm⁻¹、 1672 cm⁻¹、0~1200 cm⁻¹等出现多个酰胺键中强特征 峰(图 2a),综上可以看出 C60 和 GE11 被偶联在磁性 颗粒的表面;磁滞曲线显示 C60-IONP-GE11 与 IONP 有相似的磁饱和强度(图 2b)。

2. EGFR 高表达肿瘤细胞株的筛选

免疫荧光结果显示,DAPI 染液将细胞核染成蓝 色,MDA-MB-231 细胞膜上有大量 Cy3 荧光(图 3)。

3. 体外 MRI 成像实验及普鲁氏蓝染色实

为了评价多功能对比剂 C60-IONP-GE11 的靶向

表1 C60-IONP-GE11 实验组和 C60-IONP-RP 对照组处理后的 MDA-MB-231 细胞的 T₂ 值

组别	浓度(µg/mL)							
	25	50	100	200	400			
实验组	103.74 ± 0.92	115.50 ± 0.74	37.76 ± 0.44	16.61 ± 0.37	1.84 ± 0.15			
对照组	92.04 ± 1.64	122.83 ± 1.76	111.23 ± 0.85	105.73 ± 1.36	57.95 ± 0.51			

4. 细胞毒性实验

5. 体外光动力实验

为了研究 C60-IONP-GE11

小肽 C60-IONP-RP 对照组激光

处理后细胞存活率为(83.39±3.

95)%, 而 C60-IONP-GE11 实验 组激光处理后的细胞存活率仅为

为了评估对比剂 C60-IONP-



718

图 1 C60-IONP-GE11 的 A)TEM; B)DLS; C)Zeta 电位; D)Zeta 电位统 a) C60-IONP-GE11 合成 FTIR 图; b) IONP 和 C60-计表。 图 2 IONP-GE11 磁化曲线。

性和成像能力,对 EGFR 高表达的 MDA-MB-231 细 胞进行体外 MR 成像。C60-IONP-GE11 浓度为 100 μg/mL时, T₂WI开始出现负性强化,随着浓度增 加,T₂WI 信号降低,非靶向随机小肽 C60-IONP-RP 对照组未见明显负性强化(图 4)。表 1 示,分析实验 组与对照组浓度与 T₂ 值的相关性,结果显示实验组 和对照组的浓度与 T₂ 值均呈负相关(R 值为一0.928、 一0.540,表1),其中实验组的相关性较对照组更强,并 可得实验组线性回归方程为 Y=145.898-30.269× X, R2 = 0.862.

普鲁士蓝染色结果显示,C60-IONP-GE11 实验组 可见细胞明显蓝染, 非靶向随机小肽 C60-IONP-RP (22.79±4.84)%,差异有统计学意义(P<0.001,图7, 表 2)。

ROS 检测结果显示,实验组靶向对比剂 C60-IONP-GE11+激光组处理细胞后可见细胞内有大量 绿色荧光,而单纯激光组、C60-IONP-GE11 无激光组 未见明显绿色荧光,非靶向对比剂 C60-IONP-RP+激 光处理细胞后细胞内见少量绿色荧光,并且随对比剂 浓度的增加,实验组细胞内绿色荧光增多(图 8)。对 荧光染色结果进行半定量分析(图 9),实验组靶向对 比剂 C60-IONP-GE11+激光组与单纯激光组、C60-IONP-GE11 无激光组、非靶向对比剂 C60-IONP-RP +激光组的 ROS 荧光强度差异具有统计学意义(F=

表 2 各组与实验组对比统计表

(I) VAR00001	(J) VAR00001	平均差异	标准误	P 值	95% CI
单纯激光组	C60-IONP-GE11 激光组	69.66157*	2.83665	<0.001	62.3080~77.0151
C60-IONP-GE11 无激光组	C60-IONP-GE11 激光组	73.06341*	2.83665	<0.001	65.7098~80.4170
C60-IONP-RT 激光组	C60-IONP-GE11 激光组	60.60122*	2.83665	<0.001	$53.2477 \sim 67.9548$

注:P<0.001,差异有统计学意义



图 3 MDA-MB-231 细胞 EGFR 表达免疫荧光图(激光共聚焦扫描显微镜 下×1000,标尺为 5 μ m)。a)DAPI 染核;b)Cy3 染膜;c)明场细胞轮廓;d) 核膜融合图。 图 4 a)C60-IONP-GE11 处理后的 MDA-MB-231 细胞的 T₂WI 图;b)C60-IONP-RP 处理后的 MDA-MB-231 细胞的 T₂WI 图。 图 5 MDA-MB-231 细胞的普鲁士蓝染色图(荧光倒置显微镜,×1000,标 尺为 20 μ m)。a)C60-IONP-GE11 处理后;b)C60-IONP-RP 处理后。

2288.539, P < 0.001)

讨 论

近年来,纳米材料技术的兴起为癌症的诊治开辟 了新前景,其中以多功能磁性纳米粒子为基础的多模 式成像和癌症协同治疗已成为分子影像领域发展的新 研究方向之一[9-11]。

GE11 是特异性靶向上皮源 性肿瘤细胞膜 EGFR 受体的小分 子多肽,序列为YHWYGYT-PQNVI^[12-13],本研究为保护小肽 功能区活性,在首尾各加上两个氨 基酸,构成 QKYHWYGYTPQN-VIQK:GE11 内化但不激活 EG-FR,犹如天然的表皮生长因子配 体,从而避免促进肿瘤生长^[6]。 EGFR 是位于细胞膜表面的跨膜 糖蛋白[14],过表达于各种上皮来 源的肿瘤,包括非小细胞肺癌、乳 腺癌、头颈癌、胃癌、食管癌、前列 腺癌、膀胱癌等[15]。免疫荧光实 验结果显示 MD-MBA-231 细胞膜 表面产生大量红色荧光,表明 MD-MBA-231 细胞的 EGFR 表达 量多,与文献报道一致[16],这是我 们选择 MD-MBA-231 细胞株进行 体外 MRI 成像及 PDT 治疗原因。

C60-IONP-GE11 的 TEM 图 示制备的纳米颗粒尺寸均一,水合 粒径约 29.4 nm,当纳米颗粒粒径 在 10~100 nm 区间时,肝脾网状 内皮系统对其的吞噬减少^[17],体 内血液循环的时间延长,进一步增 加了肿瘤病灶对 USPIO 的有效 结合时间和摄入时间^[18]。FTIR 各峰可见 C60 特征峰,Fe-O 峰,酰 胺键特征峰,GE11 共振峰,表明 C60 和 GE11 被偶联在磁性颗粒 的表面。饱和磁化强度随外加磁 场的变化而变化,磁饱和度约为 53.4 emu/g,几乎无磁滞现象,呈 现超顺磁性,可用于 MRI 成像。

超顺磁性氧化铁纳米粒可作 为磁共振成像的阴性造影剂,即在 T₂ 加权像中显示为低信号^[19]。 MD-MBA-231 与 C60-IONP-

GE11 孵育后, PBS 洗去未结合的对比剂, 当 C60-IONP-GE11 在浓度为 100 μ g/mL 时, MD-MBA-231 细胞开始出现 T₂ 信号的负性强化, 当浓度升至 200 μ g/ml时 T₂ 信号已接近背景值, 随浓度增高 T₂ 信号负性强化增强, 表明 C60-IONP-GE11 可体对乳 腺癌细胞靶向成像; 普鲁士蓝染色实验显示靶向组细



图6 不同浓度的 C60-IONP-GE11 细胞毒性实验。 **图**7 各激光组处理后 MDA-MB-231 的细胞存活率 及统计分析结果。A 为单纯激光组,B 为 C60-IONP-GE11 无激光组,C 为 C60-IONP-RP 激光组,D 为 C60-IONP-GE11 激光组。 **图**8 a)单纯激光组;b)C60-IONP-GE11 无激光组;c)C60-IONP-RP 激光组;d)200 µg/mL C60-IONP-GE11+激光组;e)400 µg/mL C60-IONP-GE11+激光组;f)800 µg/mL C60-IONP-GE11 +激光组处理后 MDA-MB-231 细胞的活性氧检测图(激光共聚焦扫描显微镜下×2000,标尺为 20 µm)。

胞明显蓝染,而对照组未见染色。YANG 等^[20]用 GE11 肽修饰 USPIO,与 EGFR 高表达 H1299 人非小 细胞肺癌细胞孵育后普鲁士蓝染色可见细胞明显蓝 染,腋下荷瘤裸鼠 MR 成像结果显示,尾静脉注射 1 h 后肿瘤区域 T₂ 信号明显下降;MA 等^[21]开发 AFP 和

GPC3 双抗原靶向的 USPIO 探针,体外对 Hepal-6 小 鼠肝癌细胞 MR 成像,显示实验组 T₂WI 信号下降幅 度明显,普鲁士蓝染色显示细胞明显蓝染; ZHAO 等^[22]合成适配体(aptamer,Apt)介导的超小超顺磁性 铁纳米粒子(Ultrasmall superparamagnetic iron ox-



图9 A)单纯激光组;B)C60-IONP-GE11 无激光组; C)C60-IONP-RP 激光组;D)200 µg/mL C60-IONP-GE11+激光组;E)400 µg/mL C60-IONP-GE11+激 光组;F)800 µg/mL C60-IONP-GE11+激光组处理后 MDA-MB-231 细胞的 ROS 荧光半定量折线图。

ide,USPIO)探针,MR体外 T₂WI 成像显示 Apt-US-PIO 孵育的 Huh-7 人肝癌细胞信号强度随对比剂浓 度升高,T₂ 信号逐渐降低,普鲁士蓝染色试验观察到 Huh-7 肝癌细胞对 Apt-USPIO 有特异性摄取;本研 究与前人结果基本一致。

CCK-8 试剂可被活细胞氧化还原生成可溶性的 橙黄色甲瓒,因此培养液颜色的深浅与活细胞成正比, 与细胞毒性成反比,通过测定反应产物的 OD 值即可 简便且准确的反映存活细胞的数量。本课题选用 CCK8 试剂盒检测不同浓度 C60-IONP-GE11 对 MD-MBA-231 细胞存活情况的影响,结果显示不同浓度 C60-IONP-GE11 处理后,随着浓度的增加, MDA-MB-231 细胞的存活率稍降低,但均在 80%以上,根据 细胞毒性评级标准,当细胞存活率>75%时可视为无 细胞毒性[23],故 C60-IONP-GE11 几乎无毒,可用于后 续光动力治疗实验。LI^[24]等合成水溶性 C60 衍生物, 在无光照条件下,80 µg/ml、150 µg/ml、300 µg/ml的 水溶性 C60 对 SMMC-7721 人肝癌细胞的细胞抑制率 均在 10% 以下; FU^[25] 等发现当 IONP 浓度为 30 µg/ml时,4T1 人乳腺癌细胞的细胞存活率仅下降 不到10%。

光动力学治疗是指用特定波长的激光照射吸收了 光敏剂的靶组织,产生单线氧、活性氧杀伤病变细胞而 正常细胞不受影响^[26],其发生条件有三个:适宜波长 激光、光敏剂、氧气^[27]。ROS产生过多,细胞则进入 氧化应激状态,从而激发肿瘤细胞损伤、肿瘤血管破坏 等杀伤效应^[28-30]。PDT治疗肿瘤的机制主要包括 I 型反应(产生活性氧)和 II 型反应(产生单线态氧 1O2)^[31]。C60作为一种新兴的光敏剂,被广泛应用于 光动力治疗,C60光动力治疗更倾向于发生 I 型反应 产生活性氧物质^[32,33],因此细胞内活性氧水平是评价 C60用于 PDT 治疗效果的重要指标。

活性氧检测试剂盒是一种利用荧光染料 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒,无荧光的 DCFH-DA 进入细胞后可被活性氧氧化成有荧光的 DCF,通过观 察 DCF 的荧光强度可检测细胞内活性氧的生成水平, 本课题通过观察细胞活性氧生成水平来检验 PDT 治 疗实验结果。单纯给予光照组和单独给与 C60-IONP-GE11 孵育的 MD-MBA-231 细胞活性氧检测 阴性,说明这两组无光动力学治疗反应发生;而 C60-IONP-RP 激光组细胞活力稍下降,可能是 C60-IONP-RP与MD-MBA-231细胞发生少量非特异性结合, C60 在激光作用下产生少量活性氧使细胞存活率稍降 低,活性氧检测证实了少量绿色荧光存在。与对照组 相比, C60-IONP-GE11 激光组细胞存活率仅为 (22.79±4.11)%,细胞活力明显下降,杀伤肿瘤细胞 效果最显著(P<0.05,具有统计学意义),目活性氧检 测实验显示大量绿色荧光存在,而且 C60-IONP-GE11 浓度增加,活性氧产生增多,光动力治疗效果增强,进 一步证明了 C60-IONP-GE11 用于光动力治疗肿瘤的 可行性。SHI 等^[34]开发了 C60-IONP-PEG-FA,体外 光动力治疗可使(73.7±1.3)%的乳腺癌细胞 MCF-7 发生凋亡。SHI 等^[35] 发现 15 µg/ml 的 C60@Au-PEG 光动力治疗 MCF-7 细胞时,可使其细胞存活率 下降至(42.8±5.2)%。Yang 等^[20]开发 Gel1-PDA-Pt @USPIOs 纳米粒子,GE11 特异性靶向 EGFR 阳性 细胞,激光照射后可使 H1299 人非小细胞肺癌细胞产 生大量 ROS 荧光,均与本研究结果类似。

综上所述,C60-IONP-GE11 多功能 MR 对比剂 兼具磁共振成像与光动力靶向治疗作用,有望同时解 决肿瘤靶向 MR 成像和治疗的问题,具有良好应用前 景。

参考文献:

- [1] El-Sherbiny IM, Elbaz NM, Sedki M, et al. Magnetic nanoparticlesbased drug and gene delivery systems for the treatment of pulmonary diseases[J]. Nanomedicine, 2017, 12(4):387-402.
- [2] Dulińska-Litewka J, Łazarczyk A, Hałubiec P, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles-current and prospective medical applications[J].Materials, 2019, 12(4):617.
- [3] Zhao S, Yu X, Qian Y, et al. Multifunctional magnetic iron oxide nanoparticles: an advanced platform for cancer theranostics [J]. Theranostics, 2020, 10(14):6278-6309.
- [4] Shi J. Chen Z. Wang L. et al. A tumor-specific cleavable nanosystem of PEG-modified C60@ Au hybrid aggregates for radio fre-

quency-controlled release, hyperthermia, photodynamic therapy and X-ray imaging[J].Acta biomaterialia,2016,29(1):282-297.

- [5] Yan Y, Zhang K, Wang H, et al. A fullerene based hybrid nanoparticle facilitates enhanced photodynamic therapy via changing light source and oxygen consumption[J].Colloids Surf B Biointerfaces, 2020,186:110700.
- [6] Li Z, Zhao R, Wu X, et al. Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics [J]. FASEB J, 2005, 19 (14): 1978-1985.
- [7] Singh D, Attri BK, Gill RK, et al. Review on EGFR inhibitors: critical updates[J]. Mini Rev Med Chem, 2016, 16(14): 1134-1166.
- [8] Chen P, Luo X, Nie P, et al. CQ synergistically sensitizes human colorectal cancer cells to SN-38/CPT-11 through lysosomal and mitochondrial apoptotic pathway via p53-ROS cross-talk[J].Free Radic Biol Med,2017,104:280-297.
- [9] Curcio A, Silva AKA, Cabana S, et al. Iron oxide nanoflowers @ CuS hybrids for cancer tri-therapy: interplay of photothermal therapy, magnetic hyperthermia and photodynamic therapy [J]. Theranostics, 2019, 9(5): 1288-1302.
- [10] Shah SA, Aslam Khan MU, Arshad M, et al. Doxorubicin-loaded photosensitive magnetic liposomes for multi-modal cancer therapy[J].Colloids Surf B Biointerfaces, 2016, 148, 157-164.
- [11] Du B, Han S, Li H, et al. Multi-functional liposomes showing radiofrequency-triggered release and magnetic resonance imaging for tumor multi-mechanism therapy[J].Nanoscale, 2015, 7(12): 5411-5426.
- [12] Zou Y, Xia Y, Meng F, et al. GE11-directed functional polymersomal Doxorubicin as an advanced alternative to clinical liposomal formulation for ovarian cancer treatment [J]. Mol Pharm, 2018,15(9):3664-3671.
- [13] Pi J.Jiang J.Cai H.et al.GE11 peptide conjugated selenium nanoparticles for EGFR targeted oridonin delivery to achieve enhanced anticancer efficacy by inhibiting EGFR-mediated PI3K/ AKT and Ras/Raf/MEK/ERK pathways[J].Drug Deliv, 2017, 24(1):1549-1564.
- [14] Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer[J].Mol Oncol,2018,12(1);3-20.
- [15] Biscaglia F, Rajendran S, Conflitti P, et al. Enhanced EGFR targeting activity of plasmonic nanostructures with engineered GE11 peptide[J].Adv Healthc Mater, 2017, 6(23): 1700596.
- [16] Yook S, Cai Z, Lu Y, et al. Radiation nanomedicine for EGFRpositive breast cancer: panitumumab-modified gold nanoparticles complexed to the β-Particle-Emitter,¹⁷⁷Lu[J].Mol Pharm,2015, 12(11):3963-3972.
- [17] Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications[J]. Biomaterials, 2005,26(18):3995-4021.
- [18] Saito S, Tsugeno M, Koto D, et al. Impact of surface coating and particle size on the uptake of small and ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles by macrophages[J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7:5415-5421.
- [19] 王翠,何玲,罗聪,等.油酸钠、壳聚糖和葡聚糖修饰的超顺磁性 Fe₃O₄纳米粒作为 MRI 对比剂的实验研究[J].放射学实践,

2016,31(8):789-793.

- [20] Yang C, Mi X, Su H, et al.GE11-PDA-Pt@USPIOs nano-formulation for relief of tumor hypoxia and MRI/PAI-guided tumor radio-chemotherapy[J].Biomate Sci,2019,7(5):2076-2090.
- [21] Ma XH, Wang S, Liu SY, et al. Development and in vitro study of a bi-specific magnetic resonance imaging molecular probe for hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25 (24):3030-3043.
- [22] Zhao M, Liu Z, Dong L, et al. A GPC3-specific aptamer-mediated magnetic resonance probe for hepatocellular carcinoma[J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13:4433-4443.
- Willershausen B, Marroquín BB, Schäfer D, et al. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines[J].
 J Endod, 2000, 26(12): 703-707.
- [24] Li Z.Pan LL.Zhang FL.et al.Preparation and characterization of fullerene (C60) amino acid nanoparticles for liver cancer cell treatment[J].J Nanosci Nanotechnol,2014,14(6):4513-4518.
- [25] Fu X, Wang X, Zhou S, et al. IONP-doped nanoparticles for highly effective NIR-controlled drug release and combination tumor therapy[J].Int J Nanomedicine, 2017, 12:3751-3766.
- [26] Hodgkinson N, Kruger CA, Abrahamse H. Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells[J]. Tumour Biol, 2017,39(10):1010428317734691.
- [27] Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic therapy [J]. Dermatol Clin, 2014, 32(3):415-425.
- [28] Zhao J, Duan L, Wang A, et al. Insight into the efficiency of oxygen introduced photodynamic therapy (PDT) and deep PDT against cancers with various assembled nanocarriers[J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2020, 12(1): e1583.
- [29] Moloney JN, Cotter TG.ROS signalling in the biology of cancer[J].Semin Cell Dev Biol, 2018, 80: 50-64.
- [30] Panieri E, Santoro MM.ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells [J]. Cell Death Dis, 2016, 7 (6): e2253.
- [31] Li Q, Huang C, Liu L, et al. Enhancing type I photochemistry in photodynamic therapy under near infrared light by using antennae-fullerene complexes [J]. Cytometry A, 2018, 93 (10): 997-1003.
- Li Q, Liu C, Li H. Induction of endogenous reactive oxygen species in mitochondria by fullerene-based photodynamic therapy
 J.J. Nanosci Nanotechnol, 2016, 16(6): 5592-5597.
- [33] Hu Z, Wang C, Zhao F, et al. Fabrication of a graphene/C(60) nanohybrid via γ-cyclodextrin host-guest chemistry for photodynamic and photothermal therapy [J]. Nanoscale, 2017, 9 (25): 8825-8833.
- [34] Shi J, Wang L, Gao J, et al. A fullerene-based multi-functional nanoplatform for cancer theranostic applications [J]. Biomaterials, 2014, 35(22):5771-5784.
- [35] Shi J, Chen Z, Wang L, et al. A tumor-specific cleavable nanosystem of PEG-modified C60@Au hybrid aggregates for radio frequency-controlled release, hyperthermia, photodynamic therapy and X-ray imaging[J]. Acta Biomater, 2016, 29:282-297.

(收稿日期:2021-07-29 修回日期:2022-01-09)