

❖ 实验研究

Experimental study of hematoporphyrinmonomethyl ether based PLGA nanoparticles for photoacoustic imaging-guided sonodynamic therapy

HUANG Ju, LI Pan*, WANG Zhigang, HAN Xiaoxia, LIU Fengqiu

(Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Ultrasound Molecular Imaging, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To prepare hematoporphyrinmonomethyl ether (HMME) based poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles, and to investigate their enhancement effect on photoacoustic (PA) imaging and sonodynamic therapy (SDT) efficacy in vitro. **Methods** HMME-based PLGA (HMME@PLGA) nanoparticles were synthesized using a facile double emulsion strategy. The characteristics and enhanced PA imaging capability were observed in vitro. Upon ultrasound irradiation, the reactive oxygen species (ROS) generated with MDA-MB-231 cells up-taken HMME@PLGA was investigated using flow cytometry. SDT efficacy on cellular level was further investigated. **Results** The fabricated HMME@PLGA nanoparticles were demonstrated with homogenized size and distribution, and the average diameter was (333.67 ± 17.50) nm. The Zeta potential was (-10.57 ± 1.98) mV. The encapsulation efficiency of HMME in HMME@PLGA was 75.62%, and the drug loading was 2.90%. When incubation with HMME@PLGA nanoparticles (1 mg/ml) for 24 h, the viability of MDA-MB-231 cells was 87.21%. PA signal intensities increased with the increase of HMME@PLGA concentration in vitro. Upon ultrasound irradiation, ROS was produced in MDA-MB-231 cells with the assistance of HMME@PLGA nanoparticles, further leading to cytotoxic effects and cellular death which showed obvious red fluorescence stained with Calcein-AM/PI. Meanwhile, the lysosomes structures of the dead cells disappeared when stained by acridine orange. **Conclusion** HMME@PLGA nanoparticles are successfully fabricated and can achieve PA imaging-guided SDT.

[Keywords] hematoporphyrinmonomethyl ether; photoacoustic imaging; sonodynamic therapy; nanomedicine

DOI:10.13929/j.1003-3289.201804096

载血卟啉单甲醚高分子纳米粒用于光声显像引导下声动力治疗: 实验研究

黄 菊, 李 攀*, 王志刚, 韩晓霞, 刘逢秋

(重庆医科大学附属第二医院超声科 超声分子影像重庆市重点实验室, 重庆 400010)

[摘 要] **目的** 制备一种载血卟啉单甲醚(HMME)的多功能分子探针, 评估其体外光声成像及声动力治疗(SDT)效果。 **方法** 采用双乳化法制备载 HMME 的聚乳酸-乙醇酸(PLGA)纳米粒(HMME@PLGA), 观察纳米粒的基本表征和体外增强光声显像情况, 通过流式细胞仪检测人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞与 HMME@PLGA 共孵育后在超声辐照下产生活性氧的能力, 并在细胞水平验证其 SDT 效果。 **结果** 所制备的 HMME@PLGA 纳米粒大小均一, 形态规则, 平均粒径为 (333.67 ± 17.50) nm, 表面电位为 (-10.57 ± 1.98) mV, 封装率为 75.62%, 载药量为 2.90%, 浓度为 1 mg/ml 的纳米

[基金项目] 国家自然科学基金(81371578、81771847、31630026、81630047、81771845)。

[第一作者] 黄菊(1992—), 女, 重庆人, 在读硕士。研究方向: 诊疗一体化多功能纳米粒。E-mail: cq-huangju@qq.com

[通信作者] 李攀, 重庆医科大学附属第二医院超声科 超声分子影像重庆市重点实验室, 400010。E-mail: cqlipan@163.com

[收稿日期] 2018-04-18 **[修回日期]** 2018-10-09

粒与人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞共孵育 24 h 的细胞存活率为 87.21%。随浓度增加,纳米粒光声信号逐渐增强。经超声辐照, HMME@PLGA 纳米粒能使人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞产生大量活性氧, 并产生明显细胞毒性作用, 使细胞大量死亡, Calcein-AM/PI 染色呈红色荧光; 通过吖啶橙染色观测到细胞溶酶体结构消失。结论 本研究成功制备了包裹 HMME 的高分子纳米粒, 可实现体外光声成像引导下的 SDT。

【关键词】 血卟啉单甲醚; 光声成像; 声动力治疗; 纳米医学

【中图分类号】 R456; R445.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1003-3289(2019)01-0030-06

随着精准医疗和纳米医学的发展, 诊疗一体化分子探针成为近年研究热点。利用高分子聚合物包载显像剂和药物分子, 能够实现影像学介导下的精准治疗, 提高药物的治疗效果。光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 是近年来兴起的一种新型治疗方法, 具有无创、低毒、高选择性和重复性好等优点, 被用于抗肿瘤治疗^[1-2]。因激光穿透性较差, 限制了 PDT 的应用, 使其主要用于治疗表浅器官肿瘤, 而对深部肿瘤无法达到治疗效果, 另外, 临床上所用的光敏剂在注入人体后必须避光处理, 这在一定程度上给患者造成不便^[3]。为克服 PDT 的不足, 声动力治疗 (sonodynamic therapy, SDT) 应运而生。超声无创、操作性好、组织穿透性强, SDT 将超声波和声敏剂结合, 通过超声空化作用、氧自由基产生氧化损伤等机制诱导细胞凋亡, 抑制肿瘤增殖^[4], 具有良好的应用价值。本研究以聚乳酸-乙醇酸 (PLGA) 高分子化合物包载血卟啉单甲醚 (hematoporphyrin monomethyl ether, HMME), 探讨其体外增强光声显像特性以及 SDT 效果, 旨在制作一种光声成像引导下的 SDT 分子探针, 在真正实现诊疗一体化。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及仪器 主要材料: PLGA (PLGA-COOH 聚合比 50:50, 济南岱罡生物科技有限公司); 聚乙烯醇 (PVA, Sigma); HMME (上海笛柏化学品技术有限公司); 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA, Sigma), 钙黄绿素/碘化丙啶 (Calcein-AM/PI, Sigma 公司); 吖啶橙 (acridine orange, AO) 染料 (上海碧云天生物技术公司); 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 (购自中国科学院上海细胞生物研究所)。

主要仪器: Sonics 630-0435 声振仪; DF-101 磁力搅拌器 (上海增森仪器科技有限公司); Malvern Zetasizer Nano ZS90 光粒径测量仪; Hitachi S-3400N 电子显微镜; 岛津 UV2500 UV-VIS 紫外可见分光光度计; BD FACS Vantage SE 流式细胞仪; 低强度聚焦超声 (low intensity focused ultrasound, LIFU) 治疗仪 (重庆医科大学超声分子影像学研究所研制);

Lecia TCSSP2 激光共聚焦显微镜; Visual Sonics Vevo[®] LAZR 光声成像系统。

1.2 包裹 HMME 的 PLGA (HMME@PLGA) 纳米粒的制备 采用双乳化法, 将 50 mg PLGA 和 2 mg HMME 加入至 2 ml 二氯甲烷溶液中 (油相), 常温振荡至完全溶解, 加入 200 μ l 双蒸水 (水相), 在常温条件下以声振仪声振 3 min, 功率为 100 W, 再加入 8 ml 4% PVA 溶液进行第 2 次声振, 以磁力搅拌器搅拌挥发二氯甲烷 2 h, 待二氯甲烷完全挥发, 以双蒸水离心洗涤 (10 000 r/min, 5 min) 数次, 制备获得 HMME@PLGA 纳米粒, 于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存。

1.3 基本特征观察 采用粒径仪检测纳米粒的粒径和表面电位, 在光学显微镜、透射电镜和激光共聚焦显微镜下观察其形态特征, 连续观察 1 周。

1.4 包封率、载药量和细胞存活率检测 配置不同浓度的 HMME 三氯甲烷溶液, 以紫外分光光度计测量其吸光度并绘制标准曲线, 通过标准曲线计算出包封率及载药量。将 10 μ l 浓度为 1 mg/ml 的 HMME@PLGA 纳米粒与人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞共同孵育 24 h, 采用 CCK-8 法检测细胞存活率。

1.5 体外光声显像 称取一定量琼脂, 加入适量脱气水, 以微波炉加热, 搅拌至气泡消失, 然后将 EP 管底部插入凝胶内并固定, 待其冷却凝固后取出, 制作带孔的凝胶模型。配制不同浓度 (1、2、4、8、16 mg/ml) 的 HMME@PLGA 纳米粒溶液, 分别加入至不同的凝胶孔内, 同时在另外 2 个凝胶孔内加入等量的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 和 0.48 mg/ml 的 HMME 原液 (采用浓度为 16 mg/ml HMME@PLGA 溶液, 用量根据包封率计算, 使其包载的 HMME 量为 0.48 mg/ml), 在 690 nm 激光辐照后, 以光声成像系统采集得到体外光声图。

1.6 体外活性氧检测 体外培养人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, 取对数生长期细胞, 以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板内。将细胞分为以下 6 组: ① HMME@PLGA + US 组, 每孔加入 1 ml HMME@PLGA (1 mg/ml), 培养 3 h 后, 以 PBS 洗涤 3 次, 再以 LIFU

(超声功率 1.5 W/cm^2) 辐照 30 s 后立即加入 DCFH-DA 溶剂, 放入培养箱继续孵育 30 min, 以 EDTA-胰酶消化细胞后离心, $500 \mu\text{l}$ PBS 重悬细胞, 采用流式细胞仪检测产生活性氧水平; ② HMME+US 组, 每孔加入 1 ml HMME 的重悬液 ($30.24 \mu\text{g}$ HMME), 其他步骤同 HMME@PLGA+US 组; ③ PLGA+US 组, 每孔加入 1 ml PLGA 空白球, 其他步骤同 HMME@PLGA+US 组; ④ HMME@PLGA 组, 除不用超声辐照外, 其他方法同 HMME@PLGA+US 组; ⑤ US 组, 直接对细胞孔板进行超声辐照, 超声能量及其他步骤同 HMME@PLGA+US 组; ⑥ 对照组, 细胞孔板内不加任何试剂, 亦不进行超声辐照, 直接收集细胞通过流式细胞仪检测活性氧含量。

1.7 体外 SDT 取对数生长期人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, 以 1×10^5 个/孔接种于激光共聚焦培养皿内。将细胞分为以下 4 组: ① HMME@PLGA+US 组, 向培养皿内加入 1 ml HMME@PLGA (1 mg/ml), 培养数小时后, PBS 洗涤 3 次, 超声辐照 30 s, 功率设定为 1.5 W/cm^2 , 然后加入配备好的 Calcein-AM/PI 染色 15 min, EDTA-胰酶消化细胞, PBS 洗去多余染料, 放置于激光共聚焦仪器上观察治疗效果; ② HMME@PLGA 组, 除不进行超声辐照外, 实验方法同 HMME@PLGA+US 组; ③ US 组, 除不

加入纳米乳液外, 实验方法同 HMME@PLGA+US 组; ④ 对照组, 除了不加入纳米乳液和进行超声辐照外, 其余方法同 HMME@PLGA+US 组。AO 染色: 除将 Calcein-AM/PI 染料替换成 AO 染料外, 其余步骤同 Calcein-AM/PI 染色法。

2 结果

2.1 HMME@PLGA 纳米粒的基本特性 制备的多功能纳米粒 HMME@PLGA 呈浅红色悬着乳液, 分散性好; 光学显微镜下观察, 纳米粒大小均一, 形态规则(图 1A); 在透射电镜下呈球形, 大小约 300 nm(图 1B)。通过激光共聚焦显微镜观察此纳米粒呈均匀一致的红色颗粒(图 1C)。经马尔文粒径仪测得纳米粒的粒径为 $(333.67 \pm 17.50) \text{ nm}$ (图 1D), 表面电位为 $(-10.57 \pm 1.98) \text{ mV}$ (图 1E)。该纳米粒在 1 周内大小、形态无明显变化。

HMME@PLGA 纳米粒的封装率为 75.62%, 载药量为 2.90%, 浓度为 1 mg/ml 的纳米粒与人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞共孵育 24 h 的细胞存活率为 87.21%。

2.2 体外光声显像 HMME@PLGA 纳米粒在激光照射下显示较强的光声信号(红色), 并且随浓度递增, 光声信号逐渐增强; PBS 无光声信号, HMME 原液 (0.48 mg/ml) 产生的光声信号较弱(图 2)。

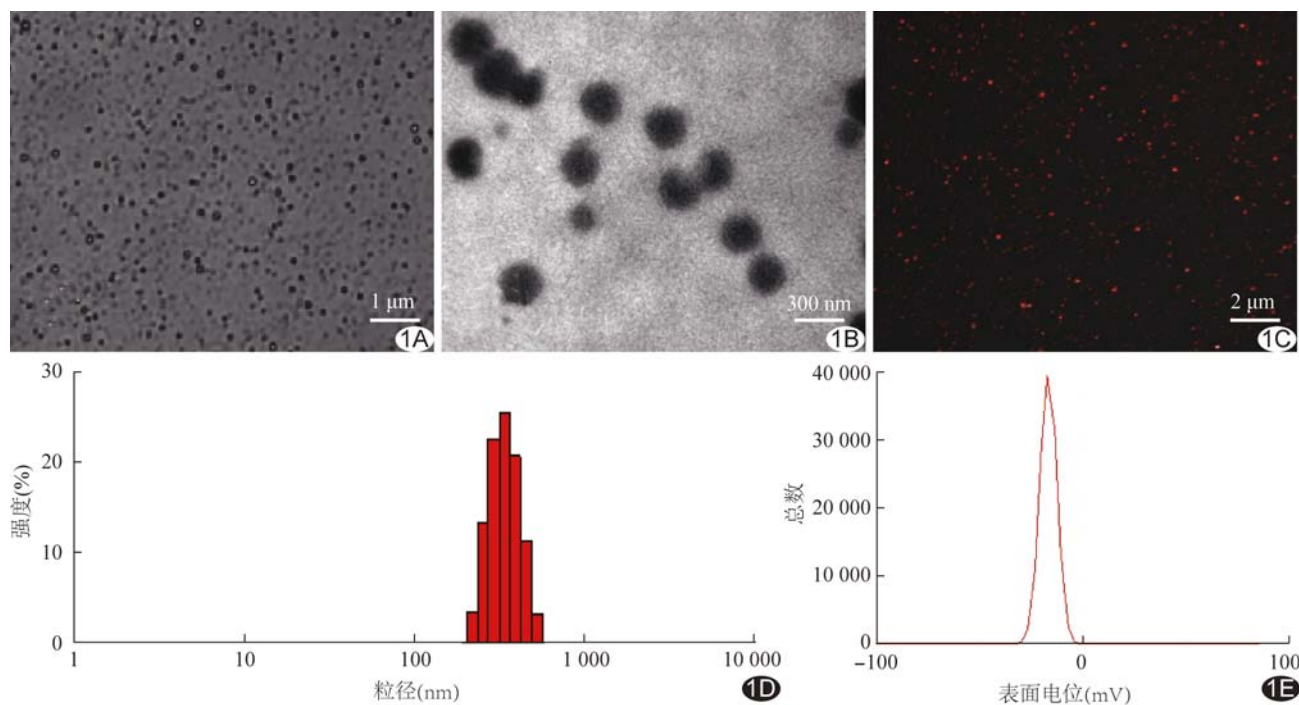


图 1 HMME@PLGA 纳米粒表征 A. 光学显微镜下观察; B. 透射电镜下观察; C. 激光共聚焦显微镜下观察; D. 粒径分布图; E. 电位分布图

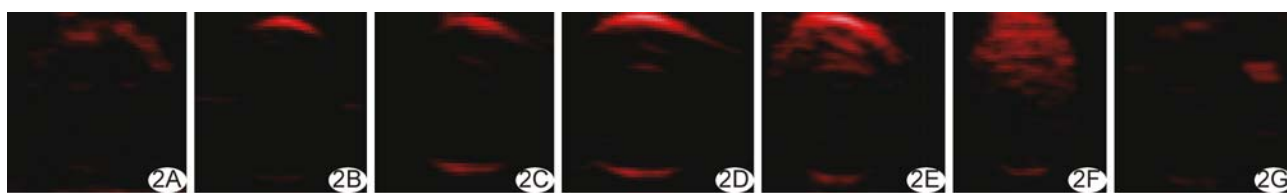


图2 HMME@PLGA 纳米粒体外光声显影图 A. PBS 溶液; B~F. 浓度分别为 1、2、4、8、16 mg/ml 的 HMME@PLGA 纳米粒溶液; G. HMME 原液(0.48 mg/ml)

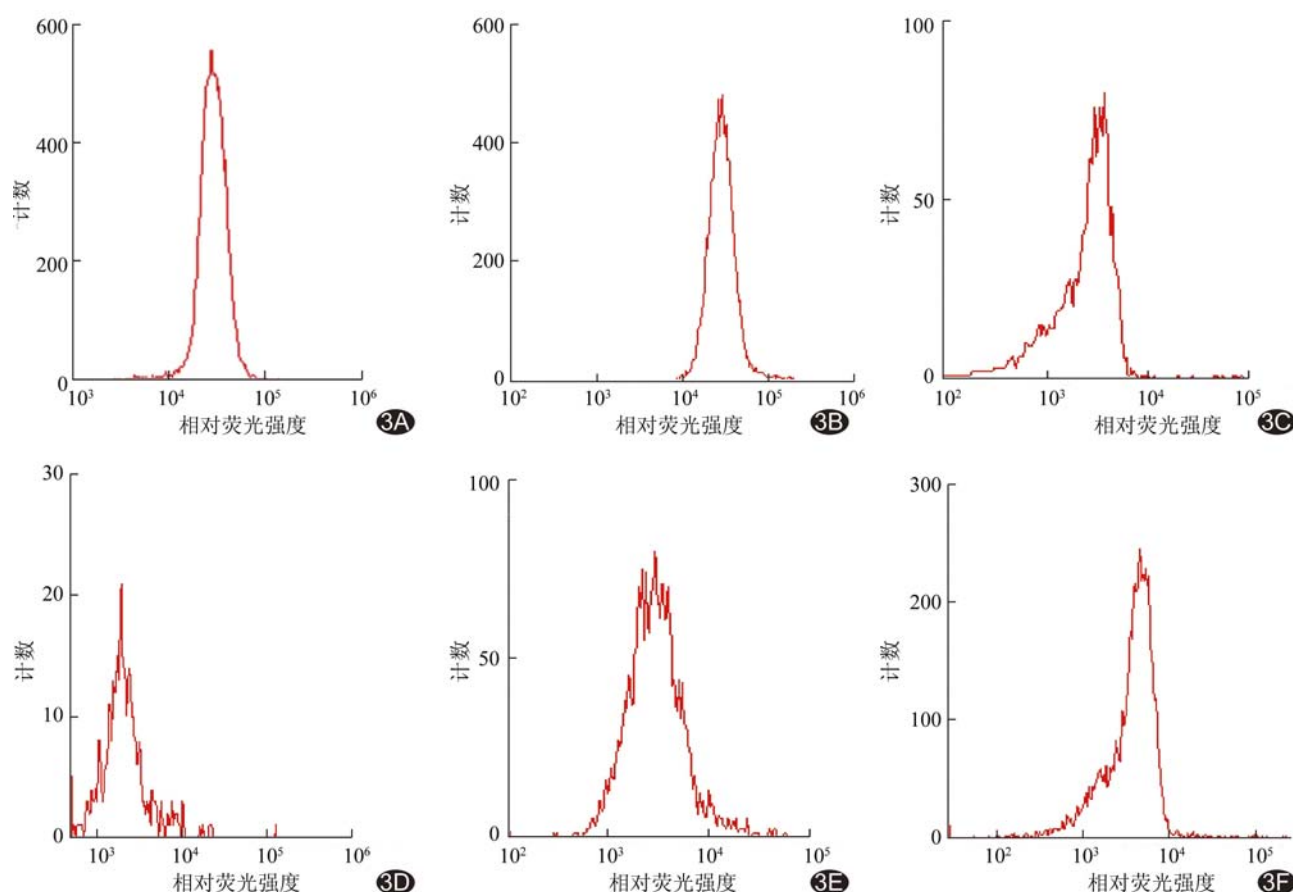


图3 流式细胞仪定量测得各组细胞的活性氧含量 A. HMME@PLGA+US 组; B. HMME+US 组; C. PLGA+US 组; D. HMME@PLGA 组; E. US 组; F. 对照组

2.3 体外活性氧检测 HMME@PLGA+US 组有大量活性氧产生,与 HMME+US 组产生的量相当,而其他各组均无明显活性氧产生(图 3)。

2.4 体外 SDT 效果 Calcein-AM/PI 染色显示 HMME@PLGA+US 组细胞大量死亡,呈红色荧光,而其他各组细胞均可见存活,呈绿色荧光(图 4A)。AO 染色显示 HMME@PLGA+US 组溶酶体不能显色,而其他各组溶酶体均被染成黄色(图 4B)。

3 讨论

恶性肿瘤已成为威胁人类健康的主要原因之一。目前治疗癌症的方式主要有化疗、放疗、手术等,虽能在

一定程度上抑制肿瘤生长,但其不良反应不容忽视^[5]。SDT 较 PDT 有显著优点,如无创、成本低、操作性强、可有效聚焦深部组织等,但许多声敏剂单线态氧产量低、光毒性作用强、结构不稳定、肿瘤组织选择性低,因而选择高效低毒的声敏剂对 SDT 的进一步发展至关重要。

HMME 具有成分单一、组成稳定、治疗后避光时间短等显著优点^[6],但显著疏水性限制了其临床应用。PLGA 具有良好的生物相容性^[7-8]和极高的生物安全性,被美国食品药品监督管理局批准应用于药物递送,同时被用于研制纳米材料,在肿瘤显像与治疗方面取得了很大进步与发展^[9]。由 PLGA 包裹 HMME 纳米

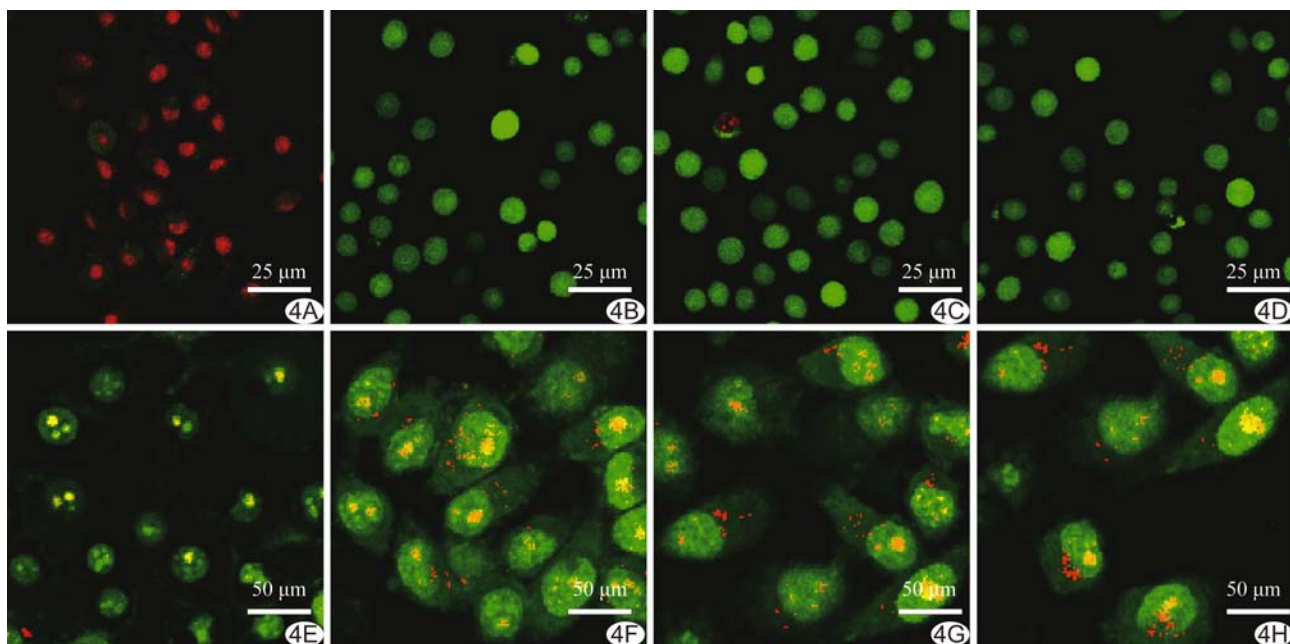


图4 激光扫描共聚焦图 A~D. 分别为 HMME@PLGA+US 组、HMME@PLGA 组、US 组、对照组 Calcein-AM/PI 染色图；E~H. 分别为 HMME@PLGA+US 组、HMME@PLGA 组、US 组、对照组 AO 染色图

粒可提高其稳定性并降低光漂白速率。研究^[10-11]表明, HMME 不仅具有 SDT 作用, 且在增强光声显像方面亦有显著效果。光声成像是生物医学领域兴起的新型成像技术, 主要利用组织光能量的吸收分布推测内部结构, 是一种无创、非电离性检测手段, 具有组织分辨力好、对比度高、穿透性强等特点^[12-13]; 然而体内存在许多固有光声信号, 如黑色素、血红蛋白等可干扰对肿瘤组织的显影。通过被动靶向作用, 纳米级光声造影剂能够选择性聚集在肿瘤病变区域, 对于提高诊断准确性、减少体内信号干扰有明显作用。

本研究通过双乳化法制备的 HMME@PLGA 纳米粒, 大小均一, 且在 1 周内大小、形态无明显变化, 表明其稳定性好。HMME 在激光激发下呈红色荧光, 激光共聚焦显微镜显示该纳米粒呈均一大小的红色颗粒, 表明 HMME 成功包载于 PLGA 内。HMME 是一种水溶性物质, 难以进行生物利用, 用 PLGA 负载后提高了 HMME 的稳定性, 克服了其疏水局限性, 有利于其进一步生物利用; 该纳米粒与人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞共孵育 24 h 后 87.21% 细胞仍能继续存活, 提示其具有较高的生物安全性。

HMME@PLGA 纳米粒在激光照射下能将光信号转化为声学信号。HMME 具有增强光声显影的作用。本研究中, 随纳米粒浓度增加, 光声信号逐渐增强; 而在同等浓度下, HMME@PLGA 纳米粒产生的光声信号明显高于 HMME 原液, 提示被包裹的

HMME 有更好的光稳定性。

DCFH-DA 本身无荧光信号, 但可自由穿过细胞膜, 当其与活性氧接触时, 可以产生有绿色荧光的 DCF, 其荧光信号强度与活性氧水平呈正比。超声波激发下, 吞噬了 HMME@PLGA 的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞呈现出明显绿色, 表明其产生了大量活性氧, 对细胞产生明显的杀伤作用, 经 Calcein-AM/PI 染色显示大片细胞坏死(红色荧光), 而单纯超声辐照或者单独纳米球并不能对细胞产生毒性作用, 对细胞存活率无明显影响(绿色荧光), 由此证实 HMME@PLGA 纳米粒在体外具有明显的 SDT 效果。为进一步验证 SDT 对细胞器的治疗效果, 本研究采用 AO 染料对细胞进行染色, 发现在对照组、US 组和 HMME@PLGA 组中可见细胞周围有大量正常溶酶体, 染色后呈黄色, 而 HMME@PLGA+US 组则由于超声辐照后活性氧的产生对细胞产生毒性作用, 细胞溶酶体结构破坏消失, 无明显染色, 进一步证实了活性氧介导的细胞毒性作用。

总之, 本研究成功制备了包裹 HMME 的高分子纳米粒, 可显著增强体外光声成像并具有良好的 SDT 治疗效果, 有望成为一种新型的诊疗一体化分子探针。

[参考文献]

- [1] Chen H, Tian J, He W, et al. H₂O₂-activatable and O₂-evolving nanoparticles for highly efficient and selective photodynamic

- therapy against hypoxic tumor cells. J Am Chem Soc, 2015, 137 (4):1539-1547.
- [2] Sun X, Dong B, Xu H, et al. Amphiphilic silane modified multifunctional nanoparticles for magnetically targeted photodynamic therapy. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(13): 11451-11460.
- [3] McEwan C, Kamila S, Owen J, et al. Combined sonodynamic and antimetabolite therapy for the improved treatment of pancreatic cancer using oxygen loaded microbubbles as a delivery vehicle. Biomaterials, 2016, 80:20-32.
- [4] Chen J, Luo H, Liu Y, et al. Oxygen-self-produced nanoplatform for relieving hypoxia and breaking resistance to sonodynamic treatment of pancreatic cancer. ACS Nano, 2017, 11 (12): 12849-12862.
- [5] Chen H, Zhou X, Gao Y, et al. Recent progress in development of new sonosensitizers for sonodynamic cancer therapy. Drug Discov Today, 2014, 19(4):502-509.
- [6] 杨智,熊英,王雪,等.血卟啉单甲醚光动力治疗.皮肤病与性病, 2014, 36(2):74-75.
- [7] Shao J, Xie H, Huang H, et al. Biodegradable black phosphorus-based nanospheres for in vivo photothermal cancer therapy. Nat Commun, 2016, 7:12967.
- [8] Chen Q, Xu L, Liang C, et al. Photothermal therapy with immune-adjuvant nanoparticles together with checkpoint blockade for effective cancer immunotherapy. Nat Commun, 2016, 7:13193.
- [9] Sun Y, Zheng Y, Ran H, et al. Superparamagnetic PLGA-iron oxide microcapsules for dual-modality US/MR imaging and high intensity focused US breast cancer ablation. Biomaterials, 2012, 33(24):5854-5864.
- [10] Niu C, Wang Z, Lu G, et al. Doxorubicin loaded superparamagnetic PLGA-iron oxide multifunctional microbubbles for dual-mode US/MR imaging and therapy of metastasis in lymph nodes. Biomaterials, 2013, 34 (9): 2307-2317.
- [11] 陈飞,郝兰,严思静,等.载血卟啉单甲醚纳米高分子微球的制备及显像实验.中国医学影像学杂志, 2016, 24(8):632-636.
- [12] Wang S, Lin J, Wang T, et al. Recent advances in photoacoustic imaging for deep-tissue biomedical applications. Theranostics, 2016, 6(13):2394-2413.
- [13] 夏晓蓉,夏纪筑,冯罡,等.一种产气超声/光声双模态纳米粒的制备及性质检测.中国医学影像技术, 2016, 32(6):835-838.

《中枢神经系统肿瘤磁共振分类诊断》已出版

《中枢神经系统肿瘤磁共振分类诊断》于 2014 年 4 月由人民卫生出版社正式出版发行。本书由安徽医科大学第一附属医院院长,安徽医科大学第四附属医院院长,安徽医科大学第一临床学院院长、影像系主任余永强主编,中华医学会放射学分会主任委员冯晓源、中华医学会放射学分会磁共振组组长卢光明写序。

全书共分为 12 章,按照 WHO 第 4 版中枢神经系统肿瘤的分类顺序撰写。内容力求图文并茂,对常见病、多发病的影像学诊断进行总结、分析、比较、归纳,对少见、罕见病的 MRI 诊断,通过复习相关文献,描述影像学表现。本书适合 MRI 诊断专业医师、影像研究生及神经外科医师阅读,对临床其他专业医师及部分影像学本科专业学生,也有助于开阔视野。

本书定价 85 元,全国各大书店有售,欢迎订阅。

