❖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,包封率为 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(hematoporphyrinmonomethyl 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,在真正意义上实现诊疗一体化。

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学研究所)。

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 紫外可见光分光光度计;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 μl 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℃ 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 μl 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:①HMME@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/cm²）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 μl PBS 重悬细胞，采用流式细胞仪检测产生活性氧水平；②HMME＋US 组，每孔加入1 ml HMME 的重悬液（30.24 μg HMME），其他步骤同 HMME@PLGA＋US 组；③PLGA＋US 组，每孔加入 1 ml PLGA 空白球，其他步骤同 HMME@PLGA＋US 组；④HMME@PLGA 组，除不用超声辐照外，其他方法同 HMME@PLGA＋US 组；⑤US 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：①HMME@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/cm²，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；②HMME@PLGA 组，除不进行超声辐照外，实验方法同 HMME@PLGA＋US 组；③US 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±17.50）nm（图 1D），表面电位为（−10.57±1.98）mV（图 1E）。该纳米粒在 1 周内大小、形态无明显变化。

HMME@PLGA 纳米粒的包封率为 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）。

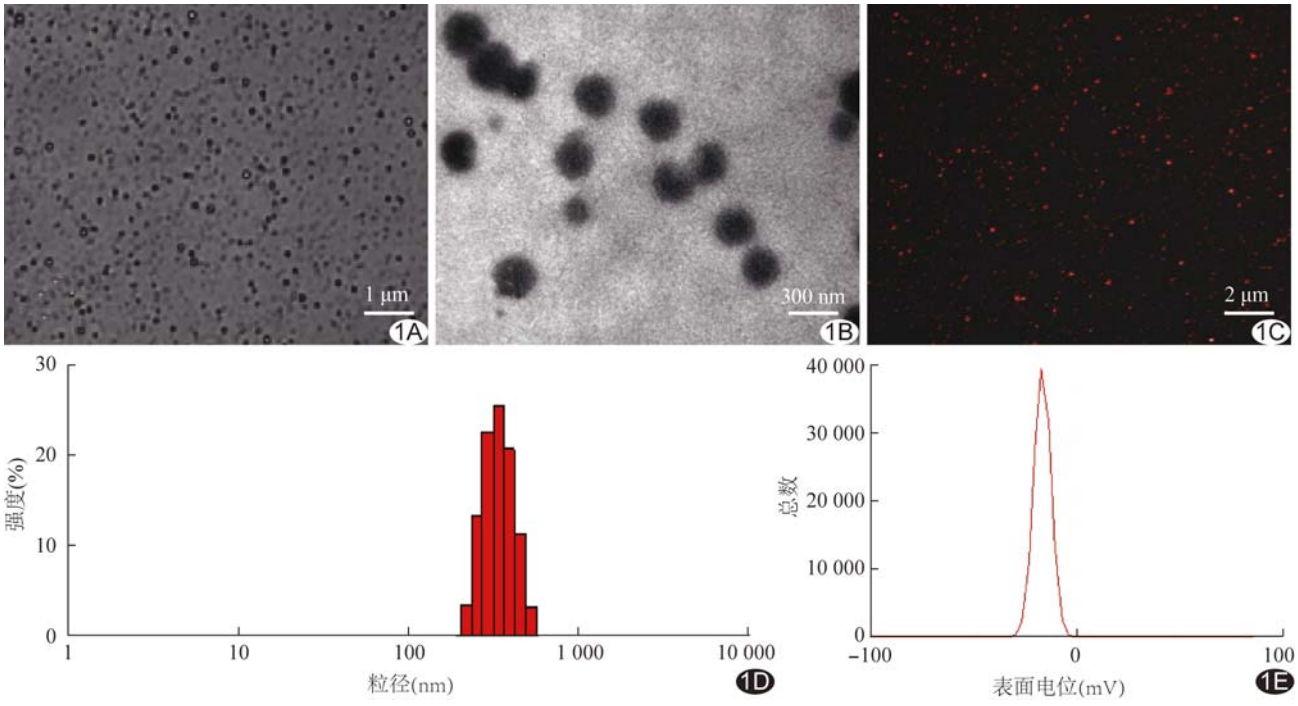


图 1　HMME@PLGA 纳米粒表征　A. 光学显微镜下观察；B. 透射电镜下观察；C. 激光共聚焦显微镜下观察；D. 粒径分布图；E. 电位分布图

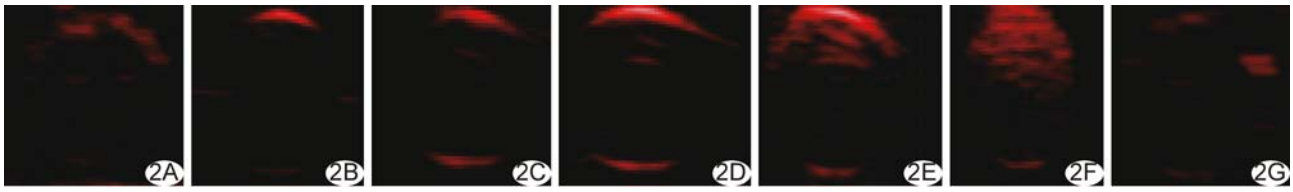


图 2　HMME@PLGA 纳米粒体外光声显影图　A. PBS 溶液；B～F. 浓度分别为 1、2、4、8、16 mg/ml 的 HMME@PLGA 纳米粒溶液；G. HMME 原液(0.48 mg/ml)

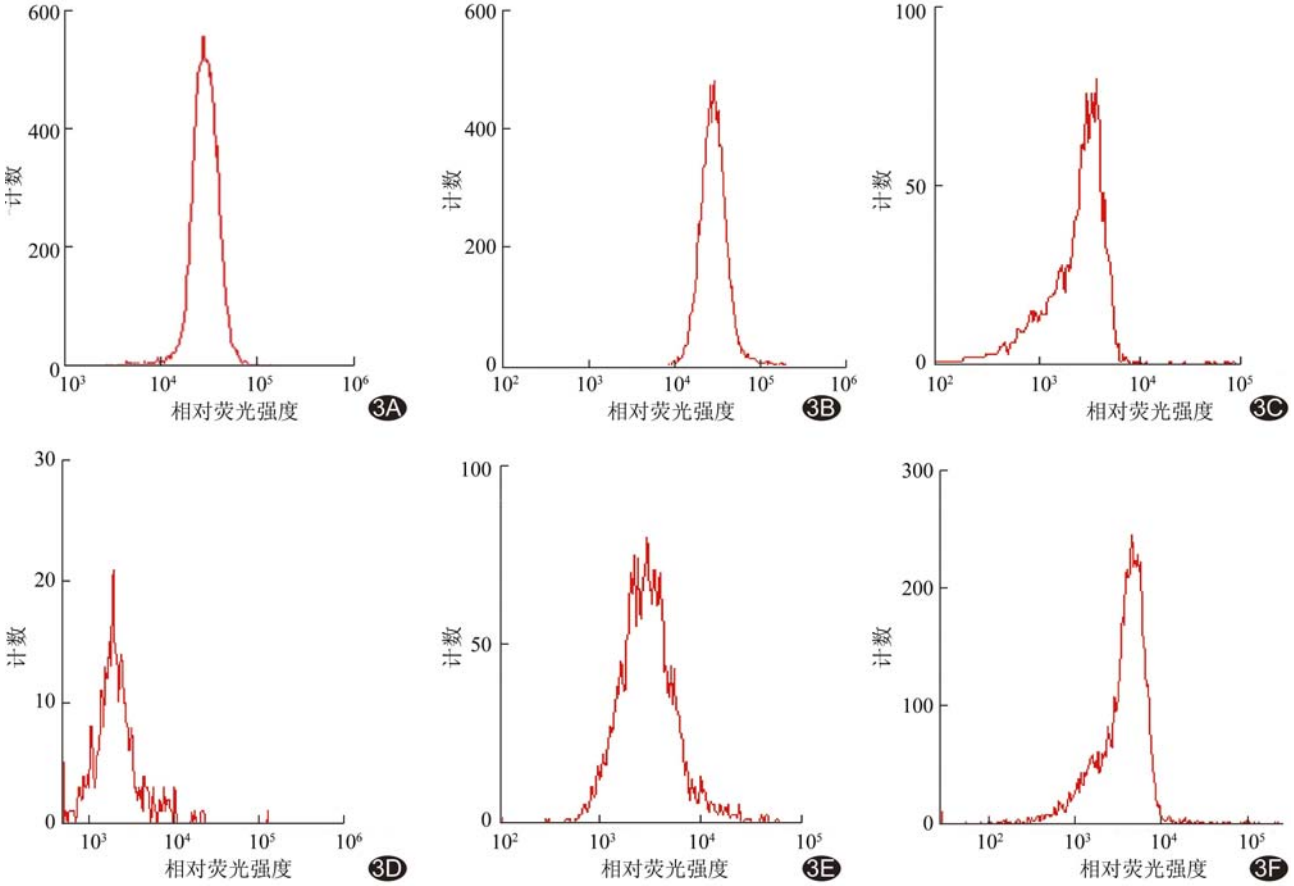


图 3　流式细胞仪定量测得各组细胞的活性氧含量　A. HMME@PLGA＋US 组；B. HMME＋US 组；C. PLGA＋US 组；D. HMME@PLGA 组；E. US 组；F. 对照组

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

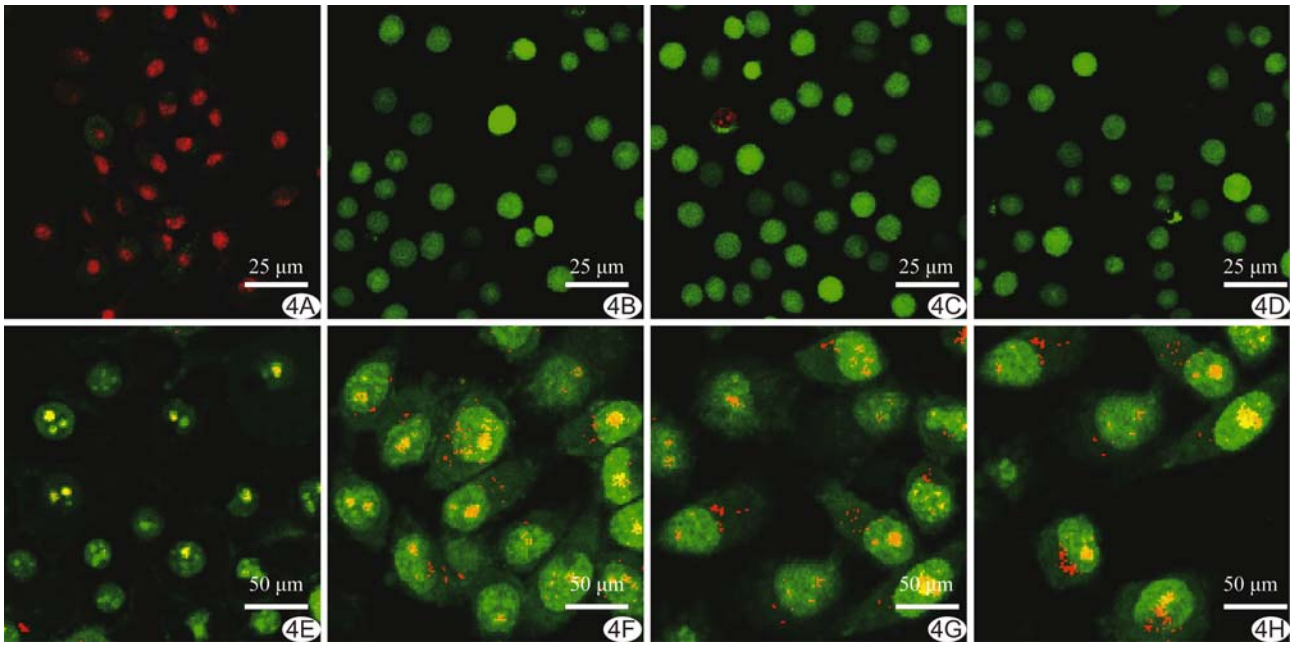


图 4　激光扫描共聚焦图　A～D. 分别为 HMME@PLGA＋US 组、HMME@PLGA 组、US 组、对照组 Calcein-AM/PI 染色图；E～H. 分别为 HMME@PLGA＋US 组、HMME@PLGA 组、US 组、对照组 AO 染色图

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. H_2O_2-activatable and O_2-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 manoparticles 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。

