

吡啶菁绿金纳米笼的制备及体外抗肿瘤活性研究[△]

俞燕娜*, 李方舟, 朱浩, 沈园园*(上海交通大学药学院, 上海 200240)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)22-3113-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.22.24

摘要 目的:制备吡啶菁绿金纳米笼(ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM),研究其体外抗肿瘤活性。方法:使用多元醇还原法制备银纳米立方体(AgNC)作为模板,通过离子置换反应制备金纳米笼(AuNC)。对AuNC形貌、粒径及近红外(NIR)光热性质进行表征。使用有机溶剂挥发法制备装载ICG、1-十四醇(PCM)、表面修饰生物素聚乙二醇巯基(Biotin-PEG-SH)的ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM,检测其粒径、多分散系数(PDI)、载药量,考察其在37、40℃下180 min内的体外累积释放度(Q)。以耐阿霉素人乳腺癌细胞(MCF-7/ADR细胞)为研究对象,采用MTT法考察ICG、ICG/PEG-AuNC-PCM、ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM的抗肿瘤活性,计算半数抑制浓度(IC₅₀)。结果:AuNC为立方体,粒径为60 nm左右,具有良好的光热性质。ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM的粒径为(105±2.8) nm, PDI为0.261±0.02(n=3);载药量为1.34×10⁸ g/mol AuNC;37℃下Q_{180 min}约为10%,40℃下Q_{20 min}约为80%。ICG、ICG/PEG-AuNC-PCM、ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM对MCF-7/ADR细胞的IC₅₀分别为95.2、29.3、16.1 μg/mL。结论:成功制得ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM,其对MCF-7/ADR细胞的抗肿瘤活性强于ICG。

关键词 金纳米笼;吡啶菁绿;光热性质;抗肿瘤活性

Preparation of Indocyanine Green Gold Nanocages and Study on Its *in vitro* Antitumor Activity

YU Yanna, LI Fangzhou, ZHU Hao, SHEN Yuanyuan (School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare the Indocyanine green gold nanocages (ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM), and study its anti-tumor activity. METHODS: Polyol reduction method was used to prepare silver nanometer cubes (AgNC) as template, ion exchange reaction was used to prepare gold nanocages (AuNC) to characterize its morphology, particle size, near infrared (NIR) light and heat properties. Organic solvent evaporation method was conducted to prepare the ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM loaded with ICG, 1-tetradecanol (PCM), surface modification of biotin polyethylene glycol mercapto (Biotin-PEG-SH). Its particle size, polydispersity index (PDI) and drug loading were detected, and *in vitro* cumulative release (Q) within 180 min under 37, 40 °C was investigated. Using adriamycin-resistant human breast cancer cells (MCF-7/ADR cells) as objects, MTT method was used to investigate the antitumor activities of ICG, ICG/PEG-AuNC-PCM and ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM, and half inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. RESULTS: AuNC was cubic with particle size of about 60 nm and good light and heat properties. The particle size of ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM was (105±2.8) nm, PDI was 0.261±0.02 (n=3). Drug loading was 1.34×10⁸ g/mol AuNC, Q_{180 min} was about 10% under 37 °C and Q_{20 min} was about 80% under 40 °C. IC₅₀ of ICG, ICG/PEG-AuNC-PCM and ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM on MCF-7/ADR cells was 95.2, 29.3, 16.1 μg/mL, respectively. CONCLUSIONS: ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM is successfully prepared, and the antitumor activity on MCF-7/ADR cells is stronger than ICG.

KEYWORDS Gold nanocages; Indocyanine green; Light and heat property; Antitumor activity

光动力治疗是一类利用光敏剂进行非入侵性肿瘤诊断和治疗的新方法^[1-2],其机制主要是通过特定波长的激光照射光敏剂,激发其于周围的氧分子进行能量/电子转移,产生具有细胞毒性的活性氧自由基,从而引起肿瘤细胞的凋亡及坏死。吡啶菁绿(ICG)是目前唯一被美国FDA认证的近红外(NIR)染料^[3-5]。有文献报道ICG具有光动力学性质,亲水性的特征使其能很好地在生物体内分布,且被强穿透力的NIR光激发后能产生活性

氧,进而发挥光动力疗效杀死肿瘤细胞^[6-7]。因此,ICG被认为是十分有潜力的光敏剂之一。

金纳米笼(AuNC)是一类新型的通过调控合成过程中氯金酸(HAuCl₄)加入量,得到NIR区不同局域表面等离子共振(Localized surface plasmon resonance, LSPR)峰的纳米载体^[8-10]。其独特的空心内部及多孔壁特征能有效地封装药物,利用其光热性质,通过局部NIR光照,使AuNC周围温度升高,一方面高温杀死肿瘤细胞,起到光热治疗的效果^[11],另一方面通过引入温敏性相变材料从而控制药物的释放。1-十四醇(PCM)是常见的相变材料,其相变温度为38~39℃,仅稍高于人体正常体温,且无毒、无腐蚀性。因此,PCM可作为AuNC的“门卫”,有效地控制药物分子的释放^[12-14]。

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81573352)

* 硕士研究生。研究方向:纳米给药体系研究。电话:021-34204793。E-mail:z3yn1991@163.com

通信作者:高级工程师,硕士。研究方向:分子药剂学和纳米给药体系。电话:021-34204793。E-mail:shenuanyuan@sjtu.edu.cn

本研究将 ICG 与 PCM 物理混合后共同封装于 AuNC 内,当体系温度低于 PCM 相变温度时,ICG 能稳定地存在于 AuNC 内部;通过 808 nm NIR 对体系进行照射,AuNC 由于光热效应导致周围温度升高,当温度达到 PCM 相变温度时,PCM 从固态转变为液态,从而使 ICG 从 AuNC 内部释放出来,发挥光动力治疗,起到光热/光动力联合治疗的效果。此外,在 AuNC 表面进行表面修饰生物素聚乙二醇巯基(Biotin-PEG-SH)修饰,可增加载体在水中的分散性,有效地靶向肿瘤细胞,增加药物的抗肿瘤效果。现将相关内容报道如下。

1 材料

1.1 仪器

HC-2066 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);JEM-2010 透射电镜(日本 Jeol 公司);Zetasizer Nano S 动态光散射仪(英国 Malvern 公司);LE-LS-808-2000TFCA 808 nm 高温激光器、LENS-808CC-A5 808 nm 光纤激光连接器(深圳欧立光电技术有限公司);Varioskan Flash 酶标仪(美国 Thermo 公司);BD LSRGortessa 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 药品与试剂

硝酸银(AgNO_3)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:MKBX7704V、MKBN3006V);硫化钠九水合物($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$)、PCM[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号:H1527014、B1502036]; $\text{HAuCl}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (国药集团化学试剂有限公司,批号:20160321);ICG 原料药[梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,批号:8SH-BJ-CG,纯度:99%];聚乙二醇巯基(PEG-SH)、Biotin-PEG-SH(重均分子量:2 000)(北京键凯科技股份有限公司,批号:H20150909、20160419BL02);1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号:1786043);MTT、胰酶、胎牛血清(FBS)(上海索莱宝生物科技有限公司,批号:303H0510、20150623、140716);活性氧检测试剂盒(南京碧云天生物技术有限公司,批号:S0033);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

耐阿霉素人乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞(中国科学院上海药物研究所)。

2 方法与结果

2.1 AuNC 的制备

制备银纳米立方体(AgNC)作为模板。调节磁力搅拌油浴锅的转速为 300 r/min,温度为 150 °C。移取 6 mL 乙二醇于 25 mL 反应瓶中,预热 1 h 后,在溶液中加入 200 μL Na_2S 溶液,随后加入 3 mL PVP 和 1 mL AgNO_3 ,继续反应 15 min,观察颜色由黄色变为红褐色继而变为不透明的灰绿色后停止反应,冷却至室温(现用现配)。用丙酮(丙酮的体积为反应液的 1 倍)冲洗反应液并以 6 800 \times g 离心 20 min 分离,弃上清液。产物用超纯水超

声重分散,重复洗涤 3 次,将终产物 AgNC 分散到 4 mL 超纯水中,4 °C 下密封避光保存。通过 AgNC 与 HAuCl_4 的置换反应制备 AuNC^[8]:磁力搅拌下,取 AgNC 100 μL 加入到 5 mL 超纯水溶液(含 1 g/L PVP)中,加热至微沸,10 min 后,将 0.1 mmol/L HAuCl_4 溶液用注射泵以 0.75 mL/min 的速率注入反应液中,直至反应液的紫外吸收峰位于 800 nm 为止。反应液中加入 NaCl 至饱和,1 400 \times g 离心 30 min,所得沉淀用超纯水超声重分散,重复洗涤 3 次,将最终产物 AuNC 超声分散于超纯水中,4 °C 下密封避光保存。

2.2 AuNC 的形貌

使用透射电镜观察 AgNC 和 AuNC 的形貌。AgNC 和 AuNC 的透射电镜图见图 1。

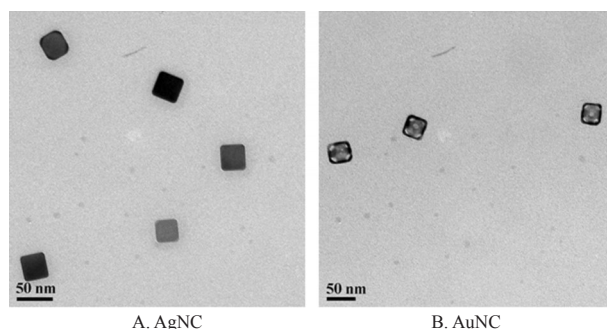


图 1 AgNC 和 AuNC 的透射电镜图($\times 900\ 000$)

Fig 1 Transmission electron micrograph of AgNC and AuNC($\times 900\ 000$)

由图 1 显示,AgNC 形貌均一、棱角分明,粒径在 50 nm 左右。AuNC 为立方体,粒径稍大于 AgNC,约为 60 nm,可见明显的中空结构及孔洞,壁厚约为 8 nm,孔径约为 6 nm。

2.3 AuNC 的光热性质

取浓度为 37.5 pmol/L 的 AuNC 溶液 200 μL 于 96 孔板,分别用 0.5、1.0、1.5 W/cm^2 功率的 NIR 对其光照,考察光热性质,记录每分钟 AuNC 溶液温度的变化。不同功率 NIR 光照下 AuNC 溶液的温度-时间曲线见图 2。

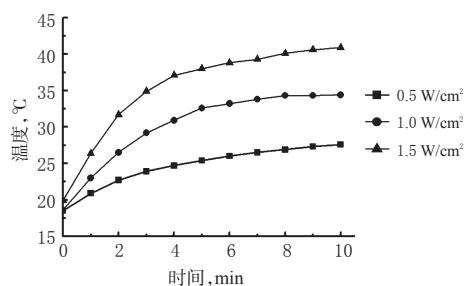


图 2 不同功率 NIR 光照下 AuNC 溶液的温度-时间曲线
Fig 2 Temperature-time curve of AuNC solution under different powers of NIR illumination

由图 2 可知,光照功率越大,溶液温度变化的速度越快。从照射开始至 5 min 时,温度上升较快,此后温度变化较小,基本达到平衡。当光照功率为 1.5 W/cm^2 时,照

射 10 min 后, AuNC 溶液的温度达到 40 ℃ 以上, 超过 PCM 的相变温度。

2.4 ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 的制备

称取 10 mg PEG-SH 混合物(PEG-SH 与 Biotin-PEG-SH 之比为 4:1) 与 10 mL AuNC(浓度约为 1 nmol/L) 在氮气保护下, 冰浴中搅拌反应 24 h, 8 390×g 离心 10 min。取沉淀, 5 mL 超纯水复溶, 洗涤 2 次, 除去未接上的 PEG, 得到 Biotin-PEG-AuNC, 4 ℃ 下密封避光保存。取制备的 Biotin-PEG-AuNC 1 mL(浓度为 1 nmol/L), 8 390×g 离心 10 min, 取沉淀用 1 mL 甲醇复溶, 置于反应瓶中, 加入 100 mg PCM, 90 ℃ 油浴中加热至融化; 待温度降至 40 ℃ 加入 1 mL ICG(2 g/L) 的甲醇溶液, 搅拌使其分散均匀, 50 ℃ 下完全挥干甲醇。上述混合物于 40 ℃ 油浴中继续加热 2 h, 加入 1 mL 热水使混合物分为 2 相, 一相为 PCM/药物的混合物, 另一相为载有 PCM/药物的 AuNC 和水(由于 AuNC 表面的亲水性, 所以优先提取出来)。PCM 由于不溶于水很难扩散到水中, 从而导致 PCM/药物仍然有效地保留在 AuNC 内。最后, 通过离心获取 ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM, 沉淀重新分散在 1 mL 超纯水中, 反复洗涤 3 次除去游离的药物, 终产物于 4 ℃ 下密封避光保存。

2.5 ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 的表征及载药量测定

使用粒径仪检测 AgNC 和 AuNC、Biotin-PEG-AuNC 和 ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 的粒径变化。4 种样品的粒径分布情况见图 3。

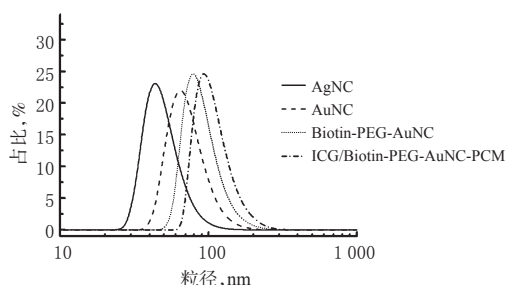


图 3 4 种样品的粒径分布情况

Fig 3 Distribution of particle sizes of 4 samples

由图 3 可知, 4 种样品中 ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 的粒径最大, 为 (105 ± 2.8) nm, 多分散系数(PDI) 为 0.261 ± 0.02 ($n=3$)。将 ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 用甲醇溶解超声后, 完全释放所装载的药物 ICG, 通过紫外分光光度计测定和回归方程计算得到载药量为 1.34×10^8 g/mol AuNC。

2.6 体外释药行为考察

取 0.5 mL ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 溶液, 用 PBS (pH 7.4) 为释放介质稀释至 2.5 mL, 于 37、40 ℃ 恒温水浴, 100 r/min 振荡进行释放试验。分别于 5、10、20、30、40、60、80、100、120、150、180 min 离心取 1 mL 上清, 并加入新鲜释放介质重悬。采用紫外分光光度计测定释

放液中 ICG 浓度, 计算累积释放量。37、40 ℃ 下 ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 中 ICG 的释放曲线见图 4。

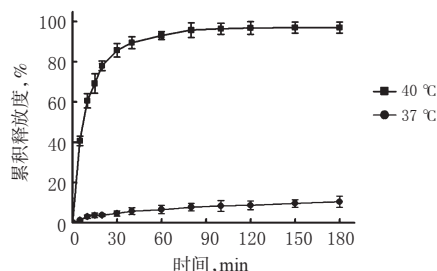


图 4 37、40 ℃ 下 ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 中 ICG 的释放曲线

Fig 4 Release curves of ICG in ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM under 37, 40 ℃

由图 4 可知, 37 ℃ 下, 180 min 后, ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 中 ICG 的累积释放量约为 10%, 说明绝大部分药物仍封装在 AuNC 内部; 40 ℃ 下, 药物迅速释放, 20 min 后, ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 中 ICG 的累积释放量约为 80%, 说明药物大部分从 AuNC 中释放出来了。由此提示, 体外释药行为具有良好的温度响应性。结合 AuNC 的光致热效应, 可以通过 NIR 照射使 AuNC 溶液温度升高从而控制药物释放。

2.7 体外细胞毒性

MTT 法测定 ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 对 MCF-7/ADR 细胞的细胞毒性。将 MCF-7/ADR 细胞以 5 000 个/孔的密度接种于 96 孔板, 培育过夜。分别将 100 μL 含有 1~100 μg/mL 系列浓度的 ICG、ICG/PEG-AuNC-PCM、ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 溶液加至细胞培养板孔中, 作用 8 h 后, 给予 NIR (1.5 W/cm²) 照射 20 min, 继续培养至 24 h。弃培养基, PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液 200 μL, 继续避光孵育 4 h 后终止培养, 弃上清, 每孔加入 200 μL 二甲亚砜溶液, 摇床轻摇 10 min 使甲臞晶体充分溶解。用酶标仪测定 570 nm 波长处的光密度, 计算细胞抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀)。3 种样品对 MCF-7/ADR 细胞的抑制率-质量浓度曲线见图 5。

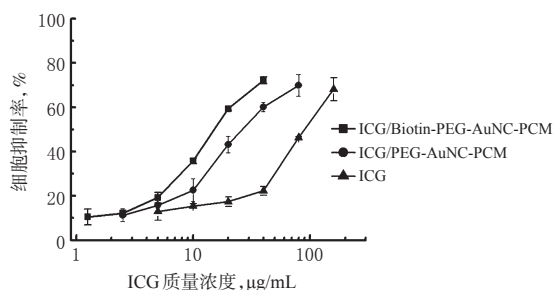


图 5 3 种样品对 MCF-7/ADR 细胞的抑制率-质量浓度曲线

Fig 5 Inhibition rate-mass concentration curves of 3 samples on MCF-7/ADR cells

由图 5 可知, 与 ICG/PEG-AuNC-PCM、ICG 比较,

ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 对 MCF-7/ADR 细胞的抑制率明显增加, ICG、ICG/PEG-AuNC-PCM、ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 对 MCF-7/ADR 细胞的 IC₅₀ 分别为 95.2、29.3、16.1 μg/mL。这表明 ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM 通过 Biotin 修饰增加了靶向性, 结合 ICG 的光动力治疗与 AuNC 的光热治疗特性有效地增加了其对细胞的杀伤作用。

3 讨论

笔者前期研究中, 以水为空白对照, 利用 808 nm 激光发射器, 考察了 1.25、2.5、5 μg/mL 的 ICG 溶液在 1.5 W/cm² 功率的 NIR 光照下 4 min 内的温度变化。结果发现, 随着 ICG 质量浓度的升高, 溶液的温度升高速度越快、增幅越大; 光照第 2~4 分钟范围内, 各质量浓度的 ICG 溶液温度变化均较小, 表明已达平台期, 说明 ICG 溶液温度变化的过程是先快后慢。

笔者前期研究中, 分别考察了有、无 NIR 光照下 18.75~100 pmol/L Biotin-PEG-AuNC-PCM 对 MCF-7/ADR 细胞抑制率的影响。结果发现, 在无 NIR 光照下, 各浓度的 Biotin-PEG-AuNC-PCM 对 MCF-7/ADR 细胞抑制率均小于 10%, 说明无 NIR 光照时, 载体材料对于肿瘤细胞的毒性较小; 在 NIR 照射下, Biotin-PEG-AuNC-PCM 的细胞毒性随其浓度的增大而增加, 说明 Biotin-PEG-AuNC-PCM 在 NIR 光照下, 发挥了光热治疗的效果, 对 MCF-7/ADR 细胞有一定细胞毒性。

综上所述, 笔者成功制备了以 AuNC 为纳米载体、装载光敏剂 ICG 和相变材料 PCM 的新型 NIR 刺激响应的 ICG/Biotin-PEG-AuNC-PCM, 其对 MCF-7/ADR 细胞的抗肿瘤活性强于 ICG。

参考文献

[1] Kuo WS, Chang YT, Cho KC, *et al.* Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(11):3270-3278.

[2] Spring BQ, Rizvi I, Xu N, *et al.* The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2015, 14(8):1476-1491.

[3] Zheng X, Zhou F, Wu B, *et al.* Enhanced tumor treatment using biofunctional indocyanine green-containing nanostructure by intratumoral or intravenous injection[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2012, 9(3):514-522.

[4] Zheng X, Xing D, Zhou F, *et al.* Indocyanine green-con-

taining nanostructure as near infrared dual-functional targeting probes for optical imaging and photothermal therapy[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2011, 8(2):447-456.

[5] Zheng C, Zheng M, Gong P, *et al.* Indocyanine green-loaded biodegradable tumor targeting nanoprobe for in vitro and in vivo imaging[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(22):5603-5609.

[6] Li YY, Wen T, Zhao RF, *et al.* Localized electric field of plasmonic nanoplateform enhanced photodynamic tumor therapy[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(11):11529-11542.

[7] Chen R, Wang X, Yao X, *et al.* Near-IR-triggered photothermal/photodynamic dual-modality therapy system via chitosan hybrid nanospheres[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(33):8314-8322.

[8] Skrabalak SE, Au L, Li XD, *et al.* Facile synthesis of Ag nanocubes and Au nanocages[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(9):2182-2190.

[9] Xia YN, Li WY, Cobley CM, *et al.* Gold nanocages: from synthesis to theranostic applications[J]. *Acc Chem Res*, 2011, 44(10):914-924.

[10] Skrabalak SE, Chen JY, Sun YG, *et al.* Gold nanocages: synthesis, properties, and applications[J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41(12):1587-1595.

[11] Chen JY, Glaus C, Laforest R, *et al.* Gold nanocages as photothermal transducers for cancer treatment[J]. *Small*, 2010, 6(7):811-817.

[12] Tian LM, Gandra N, Singamaneni S. Monitoring controlled release of payload from gold nanocages using surface enhanced raman scattering[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(5):4252-4260.

[13] Liu J, Detrembleur C, De Pauw-Gillet MC, *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.

[14] Moon GD, Choi SW, Cai X, *et al.* A new theranostic system based on gold nanocages and phase-change materials with unique features for photoacoustic imaging and controlled release[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(13):4762-4765.

(收稿日期:2017-03-20 修回日期:2017-05-12)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊, 欢迎投稿、订阅