

pH 敏感的氧化钽纳米材料的制备及其肿瘤靶向成像与治疗作用研究

刘斌¹, 徐小娜², 唐文强¹, 仝红娟¹, 朱周静¹, 唐初^{3*} (1. 陕西国际商贸学院医药学院, 陕西省中药绿色制造技术协同创新中心, 陕西 咸阳 712046; 2. 咸阳职业技术学院医药化工学院, 陕西 咸阳 712000; 3. 西安电子科技大学生命科学技术学院, 西安 712046)

摘要: 目的 制备以西妥昔单抗(cetuximab, C225)作为靶分子的 pH 敏感的氧化钽纳米粒(TaO_x-C225 nanoparticles, TaO_x-C225 NPs), 用于肺癌的靶向诊疗。方法 以 C225 作为靶分子连接到 TaO_x NPs 表面, 在其表面通过 pH 敏感的化学键连接功能性分子二氢卟吩 e6、化疗药物盐酸阿霉素制得靶向表皮生长因子受体的 pH 敏感性纳米材料 TaO_x-C225 NPs, 并采用透射电镜、紫外光谱、HPLC 对其进行表征和药物释放测试, 通过体外细胞试验以及活体成像试验测试 TaO_x-C225 NPs 靶向肿瘤细胞的能力以及荧光成像能力, 通过构建动物模型评价 TaO_x-C225 NPs 光动力和化疗联合杀伤肿瘤细胞的能力。结果 体外成像结果表明, TaO_x-C225 NPs 能够被肿瘤细胞 HCC827 特异性摄取; 在体内成像中, TaO_x-C225 NPs 能够特异性地汇集在表皮生长因子受体高表达的 HCC827 肿瘤组织中, 并具有较好的肿瘤与背景的对比如度。体内肿瘤治疗研究表明, TaO_x-C225 NPs 联合氙灯对肿瘤具有明显的抑制效果。此外, TaO_x-C225 NPs 对健康组织无明显毒性。结论 利用靶向分子探针技术以及荧光成像技术实现了肿瘤的精准诊断, 并通过光动力治疗与化疗的结合克服肿瘤耐药性, 实现肺癌的精确杀伤。TaO_x-C225 NPs 对未来肿瘤的诊断和局部治疗具有一定的借鉴意义。

关键词: 氧化钽; pH 敏感; 分子靶向; 联合治疗; 多模态成像

中图分类号: R914.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)05-0595-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.05.004

引用本文: 刘斌, 徐小娜, 唐文强, 等. pH 敏感的氧化钽纳米材料的制备及其肿瘤靶向成像与治疗作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(5): 595-601.

Study on pH Sensitive Tantalum Oxide Nanomaterials for Tumor Targeted Imaging and Therapy

LIU Bin¹, XU Xiaona², TANG Wenqiang¹, TONG Hongjuan¹, ZHU Zhoujing¹, TANG Chu^{3*} (1. Collaborative Innovation Center of Green Manufacturing Technology for Traditional Chinese Medicine in Shaanxi Province, School of Pharmacy, Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang 712046, China; 2. School of Pharmaceutical & Chemical Engineering, Xianyang Vocational Technical College, Xianyang 712000, China; 3. School of Life Science and Technology, Xidian University, Xi'an 712046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesize pH sensitive tantalum oxide nanoparticles with cetuximab(C225)(TaO_x-C225 NPs) as target molecule for targeted diagnosis and treatment of lung cancer. **METHODS** C225 was chose as EGFR ligand and connected to the surface of tantalum oxide nanoparticles(TaO_x NPs), which further modified with the photodynamic drug dihydroporphyrine e6 and chemotherapeutic drug doxorubicin hydrochloride through the amino-carboxyl reaction to produce the EGFR-targeted pH sensitive nanometer drug carriers TaO_x-C225 NPs. The morphology and spectra were characterized by transmission electron microscope(TEM) and UV-visible spectroscopy, respectively. Drug release rate of TaO_x-C225 NPs under different pH conditions was tested by HPLC. Subsequently, the targeting and imaging effects of TaO_x-C225 NPs were evaluated through the *in vitro* cell and *in vivo* imaging experiments using confocal laser microscopy and fluorescence imaging. Finally, the model of subcutaneous tumor was constructed to evaluate the therapeutic effect of the combination of photodynamic therapy of TaO_x-C225 NPs with chemotherap. **RESULTS** The *in vitro* imaging results showed that TaO_x-C225 NPs were specific uptake by HCC827 cells. *In vivo* imaging, TaO_x-C225 NPs also showed specific tumor accumulation with high tumor-to-background contrast on HCC827 subcutaneous tumor with high EGFR expression. Furthermore, the *in vivo* tumor treatment study revealed that the therapeutic effect of the TaO_x-C225 NPs combined xenon lamp group was significantly better than that of other groups. Moreover, the TaO_x-C225 NPs showed no significant toxicity to healthy tissues. **CONCLUSION** Targeted molecular probe technology and fluorescence imaging technology are used to achieve accurate diagnosis of tumors, the combination of photodynamic therapy and chemotherapy can overcome tumor drug resistance to achieve precise killing of lung cancer. The TaO_x-C225 NPs may have certain reference for future cancer diagnosis and treatment.

KEYWORDS: tantalum oxide; pH-sensitive; molecular target; combinational therapy; multimodal imaging

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划项目(2021JM-540, 2021JQ-885); 陕西省中药绿色制造技术协同创新中心重点培育项目(2019XT-1-05); 陕西省教育厅专项科研计划项目(21JK0510); 咸阳市分子影像与药物合成重点实验室项目(2021QXNL-PT-0008)

作者简介: 刘斌, 男, 博士, 副教授 E-mail: lb125lb@163.com ***通信作者:** 唐初, 男, 博士, 副教授 E-mail: ctang@xidian.edu.cn

据报道,恶性肿瘤中肺癌的发病率和死亡率在世界上居首位^[1]。世界卫生组织的调查数据显示,2018年全球有209万新增肺癌病例,以及176万肺癌死亡病例^[2]。在中国每年肺癌新增病例超过全世界肺癌新增病例的1/3^[3]。在临床上肺癌的治疗方法主要有化疗、放疗以及手术治疗。肺癌发现时大多为中晚期以及肿瘤的多药耐药性是造成临床化疗失败的主要原因^[3-4]。长期以来,科研人员致力于研发新型靶向纳米探针,期望通过影像技术发现早期癌灶,并通过联合治疗方式来实现肺癌的有效治疗。

金属钽在现代医学中有广泛的应用^[5-7],目前它经常被用作手术缝合线,钽丝甚至能够用作人工肌腱、人工关节以及人工神经纤维等植入人体,可见金属钽具有优良的生物相容性^[8-11]。

西妥昔单抗(cetuximab, C225)是一种嵌合性单克隆抗体,其与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)具有非常强的亲和力(比内源性配体高5~10倍),而且具有很强的特异性,因此能够靶向EGFR过表达的肿瘤细胞,这将会为EGFR过表达的肿瘤细胞的诊断和治疗带来很大的帮助^[12-14]。因此,本实验以C225作为靶分子连接到氧化钽纳米粒子(TaO_x nanoparticles, TaO_x NPs)表面,同时在其表面通过pH敏感的化学键^[15]连接功能性分子如具有荧光和光动力双重效果的二氢卟吩e6、化疗药物盐酸阿霉素(doxorubicin, DOX),得到靶向EGFR的pH敏感的纳米粒子 TaO_x -C225 NPs,见图1。C225的连接显著增强复合纳米粒子靶向肿瘤细胞的特性,使其最大程度地在肿瘤部位富集,然后通过CT和荧光双模式成像对肿瘤进行诊断,由于肿瘤部位低pH的环境导致化疗药物和光动力药物二氢卟吩e6

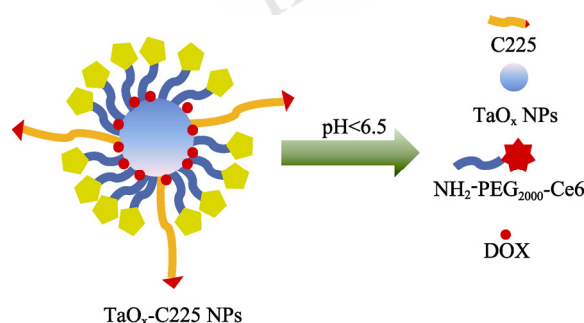


图1 pH敏感型纳米药物载体 TaO_x -C225 NPs的靶向作用机制

Fig. 1 Mechanism of targeting pH sensitive nanometer drug carriers TaO_x -C225 NPs

的快速释放,从而对肿瘤细胞进行有效杀伤。本研究对 TaO_x -C225 NPs的物理化学性质进行了一系列表征,并在肺癌荷瘤鼠模型上评价了其成像和治疗效果。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Orion AguaMate 8100型紫外-可见-近红外光谱仪(美国Thermo);JEM-2100透射电子显微镜(日本电子株式会社);DMi8-M型倒置荧光显微镜(德国莱卡);Xenogen IVIS小动物荧光成像系统(美国PerkinElmer);Agilent 1200高效液相色谱仪(美国Agilent)。

1.2 动物

SPF级BALB/c裸鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。动物实验按照国家科技委发布的《实验动物管理条例》进行。

1.3 试剂

C225(上海强耀生物科技有限公司,批号:04030000267);乙醇钽(北京百灵威科技有限公司,批号:014643);氨基聚乙二醇修饰的二氢卟吩e6(西安瑞禧生物科技有限公司,批号:R-GMR095);DOX(批号:D1515)、聚氧代乙烯(5)壬基苯基醚(Igepal®CO-520,批号:BD01098652)、(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷[(3-aminopropyl)trimethoxysilane, APTES](批号:281778)均购自西格玛-奥德里奇上海贸易有限公司。

2 方法

2.1 纳米药物载体的制备

2.1.1 TaO_x NPs的制备 称取0.23 g Igepal®CO-520,溶于25 mL环己烷中,加入0.2 mL无水乙醇,搅拌混合均匀,作为有机相;将新配制的 $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液滴加到上述有机相中,搅拌混合均匀,形成微乳,然后向上述微乳中滴加100 μL 乙醇钽,搅拌5 min,即得到氧化钽纳米粒子;最后将0.5 mL APTES滴加到上述氧化钽微乳中,反应24 h,最后通过乙醚/正己烷混合溶液进行沉淀,沉淀用乙醚纯化,最终得到表面氨基化的 TaO_x NPs。

2.1.2 TaO_x -C225 NPs的制备 使用反溶剂交联技术^[14]将DOX和氨基聚乙二醇修饰的二氢卟吩e6分子交联到表面氨基化的 TaO_x NPs上。首先将表面氨基化的 TaO_x NPs配制成 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的悬液,

并加入 10 mg DOX, 待完全溶解后将溶液的 pH 调节为弱碱性。然后加入等体积的无水乙醇溶液, 室温搅拌一段时间直至有沉淀出现。加入 0.25 mL 0.25% 的戊二醛将 DOX 通过氨基间的交联连接到纳米粒子表面, 多次离心除去游离的 DOX。氨基聚乙二醇修饰的二氢卟吩 e6 分子通过类似的方法交联到纳米粒子的表面。最终得到的 pH 敏感的纳米药物载体分散在 PBS 中, 置于 4 °C 冰箱避光保存待用。将 COOH-PEG-COOH 加入到分散的去离子水中, 搅拌溶解后, 加入十倍当量的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 反应 10 min 加入上述的纳米粒子, 30 °C 避光搅拌 24 h, 之后将一定质量的 C225 加入其中继续搅拌反应 24 h, 最后离心除去反应中的杂质、催化剂以及未连接的游离分子, 最终得到靶向 EGFR 的 TaO_x-C225 NPs, 分散于 PBS 中, 置于 4 °C 冰箱避光保存待用。

2.2 形态结构分析

将 TaO_x NPs 和 TaO_x-C225 NPs 离子分散到去离子水中, 取 10 μL 滴加在 400 目碳支持膜的铜网上, 置于通风橱内或鼓风干燥箱内干燥后, 放入透射电子显微镜内, 在加速电压为 100 kV 的条件下观察样品的大小及分布。

2.3 紫外-可见-近红外光谱分析

首先将去离子水作为空白对照扫描基线, 然后将待测样品配制成一定浓度的悬液, 置于石英比色皿中, 选择扫描范围为 400~900 nm, 对样品进行扫描, 记录其紫外可见吸收光谱。

2.4 包封率和载药量测定

精密称取 2 mg TaO_x-C225 NPs 至离心管中复溶, 用 0.5 mol·L⁻¹ 稀盐酸调节溶液 pH=5.5, 放置 48 h 后, 15 000 r·min⁻¹ 离心 1 h, 取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取滤液, 采用 HPLC 测定, 计算上清液中游离 DOX 或者二氢卟吩 e6, 记为 W₀, 并通过下面的公式计算药物的包封率(entrapped efficiency, EE)和载药量(drug loading, DL)。

$$EE(\%) = (W_0 - W_1) / W_0 \times 100\%;$$

$$DL(\%) = (W_0 - W_1) / W_t \times 100\%.$$

其中: W₀ 为 DOX 或者二氢卟吩 e6 总投药量; W₁ 为 TaO_x-C225 NPs 中游离药物量; W_t 为 TaO_x-C225 NPs 的总质量。

2.5 DOX 含量测定

精密称取一定量的 DOX, 加氯仿-甲醇(1 :

2) 配制不同浓度的 DOX 溶液。使用 HPLC 对溶液中的 DOX 含量进行测定, 测定条件: Shim-pack VP-ODS C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-水(每 500 mL 水含 1.44 g 十二烷基硫酸钠和 0.68 mL 磷酸)(5 : 50 : 40), 检测波长为 233 nm, 柱温箱温度设置为 25 °C, 进样体积为 10 μL。每个样品连续重复进样 3 次, 记录并计算峰面积, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制 DOX 的标准曲线。

样品中 DOX 的含量同样用上述条件进行测定, 并根据标准曲线计算其含量。

2.6 TaO_x-C225 NPs 药物控释行为研究

将负载药物的纳米给药系统置于透析膜中(截留分子量 8 000~12 000 Da)于 37 °C 条件下进行释药试验, 每隔一定时间, 在透析膜外面取一定液体, 并补充同样体积的不含药溶液, 保持总释药体积不变, 通过 HPLC 检测溶液中药物的含量, 通过下面的公式计算药物的累积释放速率(cumulative release percentage, CRP):

$$CRP(\%) = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{M_{DOX}} \times 100\%.$$

其中: CRP 为 DOX 的累积释放率; V_e 为释放介质的置换体积(mL); V₀ 为释放体系中释放介质的体积(mL); C_i 为第 i 次置换取样时释放液中 DOX 的浓度, C_n 为第 n 次置换取样时释放液体中 DOX 的浓度, 单位(μg·mL⁻¹); M_{DOX} 为用于释放的装载 DOX 的氧化钽纳米粒子中 DOX 的质量(μg); n 为置换释放介质的次数。

2.7 细胞摄取的评价

待细胞生长到 80% 时, 用 0.25% 的胰酶于 37 °C 条件下消化 2~5 min, 然后加入完全培养基终止消化并计数, 将细胞铺在 6 孔细胞培养板中。待细胞过夜贴壁后, 将培养基换成含有靶向 pH 敏感的 TaO_x NPs 的培养基, 孵育 4 h 后对样品进行染色观察。

2.8 肿瘤模型的构建

将 H23 和 HCC827 细胞消化后接种到 BALB/c 裸鼠(♀, 5 周龄, 15~18 g)下肢, 大约 2~3 周后形成肿瘤, 用于纳米粒子的成像和治疗。

2.9 纳米粒子在荷瘤小鼠内的分布

将荷瘤裸鼠用 2% 的异氟烷气体进行麻醉, 待裸鼠处于麻醉状态后, 将其置于小动物荧光成像系统中, 设置好荧光成像的参数(激发波长为 660 nm),

扫描过程中小鼠始终用 2% 的异氟烷气体进行麻醉。然后通过尾静脉注射 TaO_x-C225 NPs(注射剂量为 100 mg·kg⁻¹), 扫描并记录小鼠在样品注射前以及注射后不同时间点的荧光图像。

2.10 TaO_x-C225 NPs 联合治疗效果研究

首先将 35 只 HCC827 荷瘤裸鼠按照随机分组的原则分成 7 组: 生理盐水组、游离 DOX 组、游离二氢吡吩 e6 组、纳米粒子组、游离二氢吡吩 e6+ 氙灯照射组、纳米粒子+氙灯照射组、生理盐水+氙灯照射组, 每组 5 只, 给药方式均为尾静脉注射, 体积为 100 μL, 氙灯照射时间为 10 min, 强度为 1 W·cm⁻²。

肿瘤抑制率的计算公式如下:

$$\text{肿瘤抑制率} = \left(1 - \frac{\text{实验组的平均肿瘤体积}}{\text{生理盐水组的平均肿瘤体积}}\right) \times 100\%。$$

3 结果与讨论

3.1 纳米粒子物理表征

通过透射电镜扫描分析所合成的 TaO_x NPs 以及 TaO_x-C225 NPs 均是一种实心结构的微粒, 见图 2。其中 TaO_x 的粒径为(11.8±1.7)nm, 其多分散指数(polydispersity, PDI)为 0.089±0.016, 偶联抗体和载药后纳米粒(TaO_x-C225 NPs)的粒径和 PDI 有所增大, 变为(15.2±1.3)nm 和 0.097±0.035, 结果见表 1。表明制备得到的纳米粒子在水溶液中具有很好的分散性。

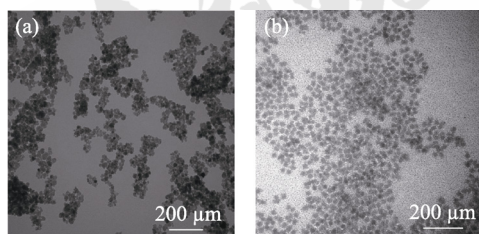


图 2 TaO_x NPs(a)和 TaO_x-C225 NPs(b)透射电镜图
Fig. 2 TEM images of TaO_x NPs(a) and TaO_x-C225 NPs(b) nanoparticles

表 1 纳米粒的主要表征参数($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 1 Main characterization parameters of nanoparticles ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品	粒径/nm	PDI
TaO _x NPs	11.8±1.7	0.089±0.016
TaO _x -C225 NPs	15.2±1.3	0.097±0.035

3.2 TaO_x-C225 NPs 紫外吸收

TaO_x-C225 NPs 的紫外-可见-近红外吸收光谱图见图 3。由图 3 可见, TaO_x-C225 NPs 在 669 nm 以及 480 nm 处出现了吸收峰, 而二氢吡吩 e6 在

665 nm 处有特征吸收, DOX 在 480 nm 处有特征吸收峰, 说明二氢吡吩 e6 和 DOX 成功连接到纳米粒子表面。二氢吡吩 e6 的吸收峰发生了红移, 可能是由于局部浓度增加所致。

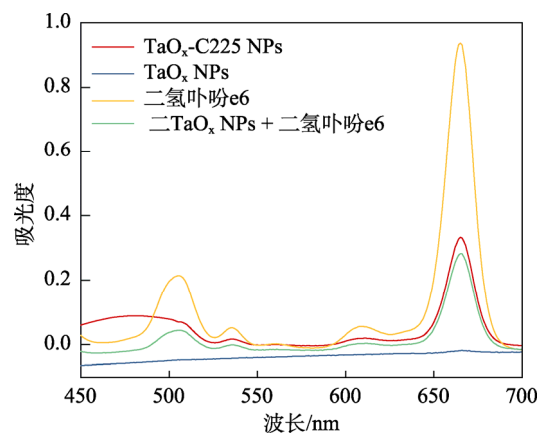


图 3 TaO_x-C225 NPs 紫外吸收光谱

Fig. 3 UV spectra of TaO_x-C225 NPs

3.3 DOX 在不同 pH 条件下的药物释放

通过 HPLC 对 DOX 进行定量, 其标准曲线为 $y=7.73x-4.06$, $R^2=0.998$ 。

戊二醛进行氨基交联的机制为在碱性条件下 pH=8.0 时, TaO_x NPs 表面的氨基与 DOX 所带的氨基或氨基聚乙二醇修饰的二氢吡吩 e6 分子所带的氨基在戊二醛存在的条件下发生交联, 形成的化学键在酸性条件下会发生断裂, 导致 DOX 或二氢吡吩 e6 分子的释放^[14]。实验中测得 DOX 和二氢吡吩 e6 的包封率分别为(80.0±3.2)%, (76.5±2.5)%, 载药量为(4.00±0.13)%, (10±0.32)%。

由于药物的释放具有 pH 敏感性, 因此考察了 TaO_x-C225 NPs 在不同 pH 条件下药物的释放情况, 结果见图 4。从释放结果中可以看出, TaO_x-C225 NPs 在酸性 pH(pH=6.5)条件下 DOX 的释放速度特别快, 20 h 内释放药物量>60%, 50 h 内释放了约 90% 的药物; 然而在中性 pH(pH=7.4)条件下, 经过四百多小时仅有 60% 左右的 DOX 释放出来。该结果验证了笔者的设想, 即 DOX 的释放具有 pH 敏感性, 这也达到了最初实验设计目标: 制备一种 pH 敏感的药物释放体系。由于二氢吡吩 e6 的连接方式与 DOX 类似, 因此其释放速率也类似。肿瘤的微环境、细胞内容酶体以及内含体等的 pH 均为酸性^[16-22], 因此本实验设计的纳米粒子 TaO_x-C225 NPs 的 pH 敏感性, 为后期有效地应用于肿瘤局部治疗提供了有力的保障。

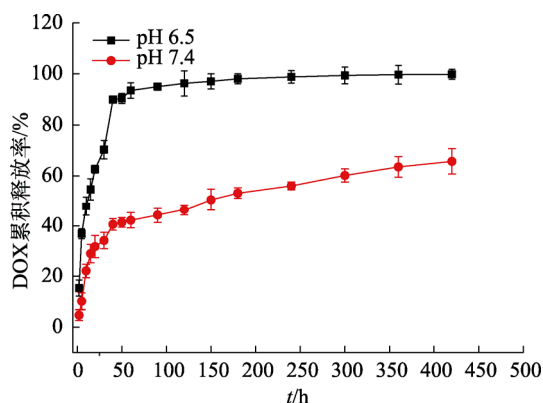


图4 TaO_x-C225 NPs 在不同 pH 条件下药物释放曲线
Fig. 4 Drug release curves of TaO_x-C225 NPs at different pH conditions

3.4 TaO_x-C225 NPs 的体内外靶向性研究

为评价 TaO_x-C225 NPs 的体外 EGFR 靶向性, 以游离的 DOX 以及非靶向的 TaO_x NPs 为对照, 与 HCC827 细胞(EGFR 高表达的细胞系)孵育一段时间后对细胞核染色进行观察, 结果见图 5。从图中可以看出, 与游离 DOX 以及非靶向的 TaO_x NPs 相比, HCC827 细胞对 TaO_x-C225 NPs 的摄取量更大, 将 DOX 修饰到 TaO_x NPs 表面并进行靶向修饰后, 大大提高了 HCC827 细胞对纳米粒子的摄取, 说明制备得到的纳米粒子 TaO_x-C225 NPs 具有很好的 EGFR 靶向性, 可以实现其在肿瘤细胞中的富集, 这将很大程度上减少化疗药物的用量。

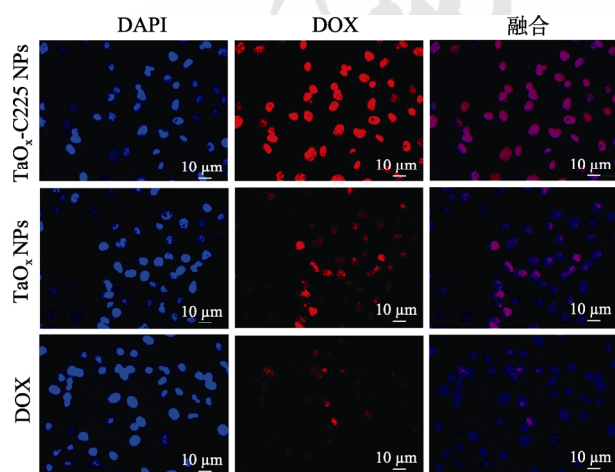


图5 HCC827 细胞对 DOX 和 TaO_x-C225 NPs 或 TaO_x NPs 的摄取
Fig. 5 Uptake of DOX, TaO_x-C225 NPs and TaO_x NPs by HCC827 cells

由于荧光成像具有极高的灵敏度, 本研究选择荧光成像技术在皮下瘤模型中进行成像, 验证纳米粒子的靶向效果。实验中采用 H23(EGFR 几乎不表达的细胞系)和 HCC827 荷瘤小鼠作为动物模型对

TaO_x-C225 NPs 的体内成像效果进行评价, 结果见图 6。从图中可以看出, 尾静脉注射靶向纳米粒子 24 h 后, 可在荷瘤小鼠肿瘤部位看到明显的荧光增强信号, 可以明确与周围正常组织进行区分, 但是肿瘤细胞 HCC827 的亮度显著高于肿瘤细胞 H23, 随着时间的延长, H23 肿瘤与正常组织的荧光差异逐渐减弱, 而 HCC827 肿瘤部位与正常组织的荧光差异在纳米粒子注射 72 h 后仍然十分显著。此外, 与非靶向 TaO_x NPs 相比, 注射 TaO_x-C225 NPs 后肿瘤组织能与正常组织明显区分, 说明靶向纳米粒子能够很好地靶向肿瘤组织且长时间滞留, 而不会对正常组织产生损伤。表明制备得到的纳米粒子 TaO_x-C225 NPs 具有很好的主动靶向性。

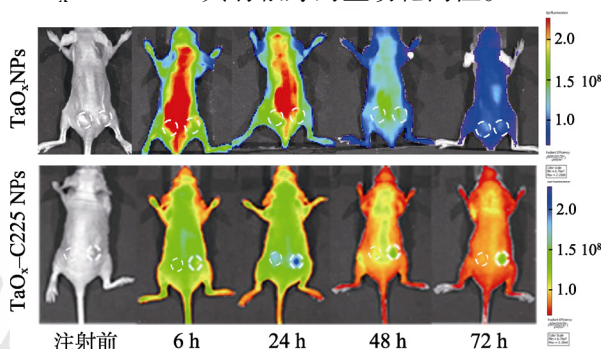


图6 荷瘤裸鼠体内纳米颗粒的荧光图像(左: H23; 右: HCC827)
Fig. 6 *In vivo* fluorescence images of nanoparticles in tumor-bearing nude mice(Left: H23; right: HCC827)

3.5 TaO_x-C225 NPs 的抗肿瘤效果研究

在移植瘤的治疗过程中, 药物的给药方式是整个治疗过程中只在开始前给一次药, TaO_x-C225 NPs 的给药剂量为 100 mg·kg⁻¹, DOX 的给药剂量为 4 mg·kg⁻¹, 二氢卟吩 e6 的给药剂量为 10 mg·kg⁻¹, 均为尾静脉注射。从各组荷瘤小鼠肿瘤在 21 d 内的生长曲线图中可以看出, 在前 18 d, TaO_x-C225 NPs 联合氩灯照射组的肿瘤抑制率为 (100±2.4)%, TaO_x-C225 NPs 组、二氢卟吩 e6 联合氩灯照射组以及单独的二氢卟吩 e6 组的肿瘤抑制率分别为 (92±3.9)%, (88±4.3)% 和 (86±2.9)%, 而游离 DOX 组和生理盐水组以及生理盐水联合氩灯照射组的肿瘤体积在治疗后第 18 天分别增长了 251%, 249% 和 123%, 结果见图 7。根据试验结果可以看出, TaO_x-C225 NPs 联合氩灯治疗组的治疗效果明显优于其他组别, 说明将药物连接到纳米粒子表面后明显增强了药物的疗效, 且光动力治疗和化疗 2 种方法联合治疗能够显著杀伤肿瘤细胞并减少复发。

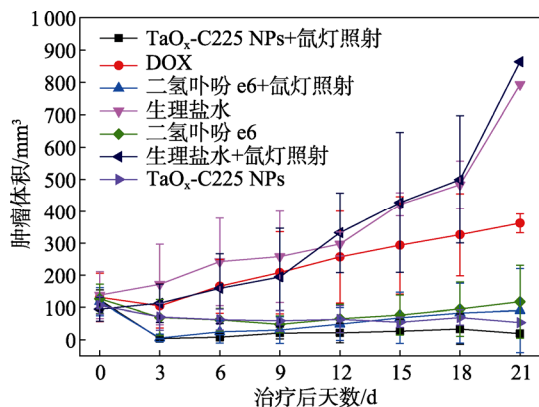


图7 不同治疗方法对HCC827异种移植瘤平均体积影响
Fig. 7 Effect of different treatments on average tumor volumes of HCC827 xenografts

在治疗过程中, 纳米材料的生物相容性可以通过荷瘤小鼠的体质量变化来反映, 以此来评价纳米材料对实验动物生理特征的影响, 结果见图8。从图中可以看出, 二氢卟吩 e6 和游离 DOX 组荷瘤裸鼠体质量给药后略有下降, 但随着时间的推移体质量重新增加, 说明游离药物可能存在急性毒性, 但不存在短、长期毒性, 而其他组别的荷瘤小鼠的体质量没有明显变化, 说明实验中的其他处理方式不会给荷瘤小鼠带来明显的不良反应。

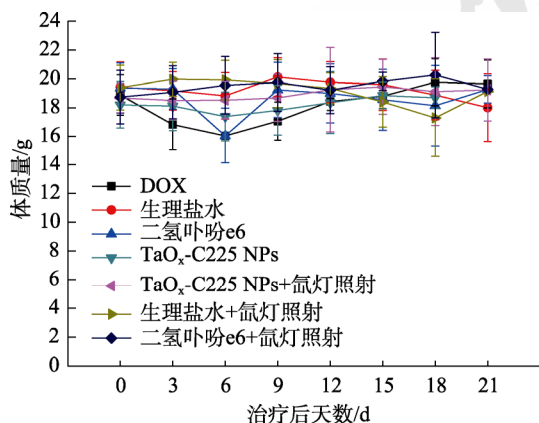


图8 不同治疗方法HCC827荷瘤小鼠平均体质量
Fig. 8 Average body weight of HCC827 xenografts after different treatments

在治疗实验结束后, 将实验小鼠通过断颈处死, 取出心、肝、脾、肺、肾等正常组织进行病理切片分析, 评价 TaOx-C225 NPs 在治疗过程中是否对正常组织产生不必要的损伤, 见图9。从图中可以看出, 与生理盐水组相比, TaOx-C225 NPs 结合氙灯照射后在整个实验过程中并未对小鼠的正常组织产生损伤, 进一步说明 TaOx-C225 NPs 不具有急性 and 短期毒性, 在一定程度上具有很好的体内生物安全性。

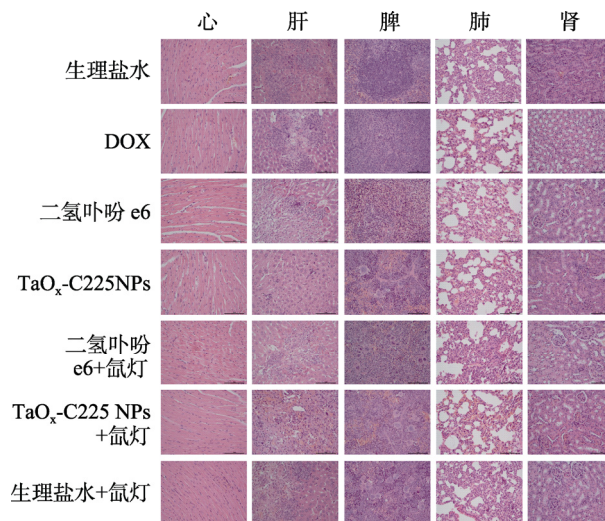


图9 不同方法治疗21 d后, HCC827 荷瘤小鼠心、肝、脾、肺、肾的 HE 染色图
Fig. 9 HE staining of the heart, liver, spleen, lung, kidney of HCC827 tumor-bearing mice after 21 d of different treatments

4 讨论

本实验构建了一种靶向 EGFR 的 pH 敏感的纳米粒子 TaOx-C225 NPs, 同时兼具成像(高灵敏度的荧光成像)和治疗(pH 敏感的化疗和光动力治疗)的双重功能。该纳米给药系统(TaOx-C225 NPs)可能会对未来肿瘤的 diagnosis 和局部治疗具有很好的借鉴意义。

REFERENCES

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] CAI Z J, LIU Q. Understanding the Global Cancer Statistics 2018: Implications for cancer control[J]. Sci China Life Sci, 2021, 64(6): 1017-1020.
- [3] JIANG S, LI H, DENG Z X, et al. Analysis of the role of CKMT1A on non-small cell lung cancer chemotherapy resistant based on data mining[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 35(1): 1368-1373.
- [4] WANG C, CHEN S Z. Advances in the mechanisms of acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2019, 54(8): 1364-1371.
- [5] MATSUNO H, YOKOYAMA A, WATARI F, et al. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium[J]. Biomaterials, 2001, 22(11): 1253-1262.
- [6] CHEN J Y, LENG Y X, TIAN X B, et al. Antithrombogenic investigation of surface energy and optical bandgap and hemocompatibility mechanism of Ti(Ta(+5))O₂ thin films[J]. Biomaterials, 2002, 23(12): 2545-2552.

- [7] FINDLAY D M, WELLDON K, ATKINS G J, et al. The proliferation and phenotypic expression of human osteoblasts on tantalum metal[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(12): 2215-2227.
- [8] JIN Y, MA X, ZHANG S, et al. A tantalum oxide-based core/shell nanoparticle for triple-modality image-guided chemo-thermal synergetic therapy of esophageal carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2017(397): 61-71.
- [9] JIN Y, LI Y, MA X, et al. Encapsulating tantalum oxide into polypyrrole nanoparticles for X-ray CT/photoacoustic bimodal imaging-guided photothermal ablation of cancer[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(22): 5795-5804.
- [10] JIN Y, MA X, FENG S, et al. Hyaluronic acid modified tantalum oxide nanoparticles conjugating doxorubicin for targeted cancer theranostics[J]. *Bioconjug Chem*, 2015, 26(12): 2530-2541.
- [11] OH M H, LEE N, KIM H, et al. Large-scale synthesis of bioinert tantalum oxide nanoparticles for X-ray computed tomography imaging and bimodal image-guided sentinel lymph node mapping[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(14): 5508-5515.
- [12] YAMAGUCHI A, ACHMAD A, HANAOKA H, et al. Immuno-PET imaging for non-invasive assessment of cetuximab accumulation in non-small cell lung cancer[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 1000.
- [13] ZHANG Q L, LIU Q, DU M H, et al. Cetuximab and Doxorubicin loaded dextran-coated Fe_3O_4 magnetic nanoparticles as novel targeted nanocarriers for non-small cell lung cancer[J]. *J Magn Magn Mater*, 2019(481): 122-128.
- [14] SU H, LIAO Y, WU F, et al. Cetuximab-conjugated iodine doped carbon dots as a dual fluorescent/CT probe for targeted imaging of lung cancer cells[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018(170): 194-200.
- [15] YANG R, AN Y, MIAO F, et al. Preparation of folic acid-conjugated, doxorubicin-loaded, magnetic bovine serum albumin nanospheres and their antitumor effects *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014(9): 4231-4243.
- [16] HU F, LIU B, CHU H, et al. Real-time monitoring of pH-responsive drug release using a metal-phenolic network-functionalized upconversion nanoconstruct[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(18): 9201-9206.
- [17] SHAN X T, MAO J, QIU L M, et al. Preparation and *in vitro* antitumor activity of pH-sensitive polymer micelles[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2020, 29(7): 810-815.
- [18] ZHU J, HUO Q, XU M, et al. Bortezomib-catechol conjugated prodrug micelles: Combining bone targeting and aryl boronate-based pH-responsive drug release for cancer bone-metastasis therapy[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(38): 18387-18397.
- [19] TAN Y, ZHU Y, ZHAO Y, et al. Mitochondrial alkaline pH-responsive drug release mediated by Celastrol loaded glycolipid-like micelles for cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2018(154): 169-181.
- [20] AHN B, LEE S G, YOON H R, et al. Four-fold channel-nicked human ferritin nanocages for active drug loading and pH-responsive drug release[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(11): 2909-2913.
- [21] TAO S Y, WANG M, ZHAI G X. Advances in stimuli-responsive nano drug delivery system based on hyaluronic acid[J]. *Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志)*, 2021, 40(5): 330-335.
- [22] YOU C Z, MAO J, XU J M, et al. Preparation and *in vitro* antitumor evaluation of pH-sensitive doxorubicin prodrug nanoparticles[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2020, 29(11): 1285-1291.

收稿日期: 2020-11-27
(本文责编: 曹粤锋)