

肿瘤微环境响应的智能纳米载体在肿瘤光动力治疗中的应用

蓝善优^{1,2}, 张达^{1,3}, 刘小龙^{1,3}, 曾永毅^{1,4}

¹ 福建医科大学孟超肝胆医院, 福建 福州 350025;

² 福建医科大学, 福建 福州 350025;

³ 福建省肝病科学研究中心, 福建 福州 350025;

⁴ 福建医科大学附属第一医院, 福建 福州 350005

摘要 光动力治疗是基于微创的新型肿瘤治疗方法, 利用光敏剂吸收外源可见-近红外光光能促使光敏剂与分子氧反应, 产生高活性光化学产物——活性氧物质, 诱导肿瘤细胞凋亡或坏死, 具有低免疫原性、低成本、高选择性等特点, 已成为癌症治疗基础研究及临床转化的新热点。然而, 实体肿瘤内微环境因子导致的光动力治疗效果下降及肿瘤细胞耐受等问题, 阻碍了光动力治疗的发展与临床医学应用。随着纳米技术与生物医学工程等交叉领域的快速发展, 以及对肿瘤微环境的深入研究, 利用肿瘤微环境因子设计的智能响应性纳米载体用于癌症的诊断与协同治疗近年来受到广泛关注。基于此, 综述了肿瘤环境响应的智能化纳米载体系统在肿瘤光动力治疗中的最新研究进展, 为肿瘤的光动力治疗提供参考与新的研究思路。

关键词 生物光学; 肿瘤微环境; 刺激因子; 光动力治疗; 智能化纳米载体

中图分类号 R454.2

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0207008

Tumor-Microenvironment Activable Smart Nanocarrier System for Photodynamic Therapy of Cancers

Lan Shanyou^{1,2}, Zhang Da^{1,3}, Liu Xiaolong^{1,3}, Zeng Yongyi^{1,4}

¹ Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350025, China;

² Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350025, China;

³ Liver Disease Center of Fujian, Fuzhou, Fujian 350025, China;

⁴ The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350005, China

Abstract Photodynamic therapy is a noninvasive therapy of cancers that utilizes exogenous visible, near-infrared light to induce the photosensitizer to react with molecular oxygen to produce a highly active photochemical product of reactive oxygen species which can induce apoptosis or necrosis of tumor cells, with low immunogenicity, low cost, high selectivity and other characteristics. Photodynamic therapy has become a hot topic in the basic research and clinical transformation of cancer treatment. However, the decreased effect of photodynamic therapy induced by tumor-microenvironment factors and the tolerance of tumor cells hinder the development of photodynamic therapy and clinical application. With the rapid development of comprehensive fields such as nanotechnology and biomedical engineering, and the deepening study of tumor microenvironment, the tumor-microenvironment activable smart nanocarrier system for the diagnosis and the synergistic treatment of cancer draw high attention in recent years. Based on this, the research of tumor-microenvironment activable smart nanocarrier system is reviewed to provide a

收稿日期: 2017-09-14; 收到修改稿日期: 2017-10-19

基金项目: 国家自然科学基金(81671813, 81601538)、福建省科技创新联合资金项目(2016Y9061, 2016Y9062)、福建省卫生教育联合攻关计划(WKJ2016-2-15)、福建省科技厅引导性项目(2015Y0056)

作者简介: 蓝善优(1993—), 男, 硕士研究生, 主要从事肝癌方面的研究。E-mail: 15659150969@163.com

导师简介: 曾永毅(1973—), 男, 博士, 副教授, 主要从事肝癌方面的研究。

E-mail: lamp1973@medmail.com.cn(通信联系人)

reference and a new research idea for photodynamic therapy of tumors.

Key words biotechnology; tumor-microenvironment; stimulating factors; photodynamic therapy; smart nanocarrier

OCIS codes 160.4236; 140.3450

1 引 言

光动力治疗(PDT)是基于微创的新型肿瘤治疗方法,已成为近年来癌症治疗的基础研究与临床转化的新热点。其原理是利用光敏剂(PS)吸收外源可见-近红外光(NIR)光能,自身由基态(S_0)转变为激发态(S_1),再与周围氧分子(O_2)反应,产生高活性激发态毒性光化学产物,如活性氧自由基(ROS),之后再与细胞内邻近的活性分子(如氨基酸、脂肪酸或核酸)等相互作用,导致直接的细胞毒性,诱导细胞凋亡或坏死^[1]。此外,光动力治疗能激活机体的免疫反应,损伤肿瘤组织脉管系统,抑制新生血管,从而达到治疗肿瘤的目的^[2]。与传统手术及放疗、化疗相比,光动力治疗具有微创可控、可重复、低免疫原性、低成本、局部高选择性等特点^[3]。然而,肿瘤组织复杂的微环境导致光动力治疗效果较低、预后效果差,阻碍了光动力治疗的临床应用。肿瘤微环境的产生原因在于肿瘤细胞生长失控,基因表达异常,导致肿瘤组织异于正常组织的生理结构与代谢特征,如肿瘤组织细胞内外的氧化还原性差异、pH 差异、肿瘤组织间质特定酶的代谢、肿瘤细胞的过快增殖以及血管畸形导致的肿瘤组织内部乏氧等^[4-5]。随着纳米技术与生物医学工程等交叉学科的不断发展,以及对肿瘤微环境机制的不断探索,基于肿瘤微环境因子设计的智能响应性纳米载体系统能有效利用肿瘤微环境异于正常组织细胞的因素,选择性地对肿瘤细胞给药,遏制肿瘤的产生、发展。因此针对肿瘤微环境因子设计的纳米载体已成为近年来改善光动力治疗的研究热点,具有一定的临床转化应用意义。基于此,本文针对不同的肿瘤微环境响应因子与纳米载体系统在肿瘤光动力治疗中的最新研究进展进行综述,为纳米技术在肿瘤光动力治疗方面的应用提供参考和新的研究思路。

2 肿瘤微环境响应的智能纳米载体

恶性肿瘤是严重威胁人类健康和生命安全的一大疾患,其中实体肿瘤占人类肿瘤的90%以上。尽管目前癌症的治疗仍以手术切除为主,辅以放疗、化疗等综合治疗,并获得了良好的治疗效果,但多种实体瘤的预后效果差^[6],其原因可能是实体肿瘤存在

的肿瘤微环境。肿瘤微环境是由肿瘤组织、免疫细胞、肿瘤细胞自身代谢及其分泌的活性物质等构成的,其对于肿瘤的产生、发展、转移及药物耐受等具有重要影响;同时,肿瘤微环境为肿瘤细胞的快速增殖与转移提供了理想的场所。因此,对肿瘤微环境的深入研究,能够有效改善传统药物递送效果差、选择性不高、治疗效果不理想等问题。此外,由肿瘤细胞生长失控、代谢异常、基因表达异常等生理过程导致的异于正常组织细胞的特征,可作为新的肿瘤靶标用于选择性给药,以提高药物疗效,同时降低传统药物对健康机体产生的毒副作用。随着纳米技术与生物医学工程等交叉学科的发展,利用肿瘤微环境因素设计的智能纳米载体用于肿瘤的临床研究与协同治疗已成为可能。通过合理设计可显著提高其对肿瘤的选择性,减少毒副作用。

2.1 pH 响应的智能化纳米载体

在肿瘤组织中,由于肿瘤细胞的增殖速度较正常细胞快,其脉管系统提供的营养物质及血氧含量不能满足其生长所需,导致肿瘤组织内部供养不足,促使肿瘤细胞发生无氧糖酵解作用以提供其生长所需能量,但同时会产生大量乳酸及三磷酸腺苷(ATP)水解产物,并释放到胞外,从而导致肿瘤部位的酸性增加,pH 较正常组织部位低。人体正常组织细胞与肿瘤细胞内的 pH 约为 7.4,而肿瘤组织区域的 pH 为 6.0~7.0,低于正常组织的 pH,正常组织细胞内容酶体的 pH 为 5.0~6.5,肿瘤细胞内容酶体的 pH 为 4.0~5.0^[7]。与此同时,由于肿瘤细胞快速无序增殖,导致血管内皮细胞增殖异常,内皮间隙较大,周细胞缺乏以及基底膜异常等,进而导致血管的通透性增强,促使血液循环中的物质渗透进肿瘤组织并滞留其中,产生高渗透长滞留(EPR)效应^[8]。而基于 pH 敏感的纳米药物载体将药物封闭于载体内部,在正常组织细胞间隙中药物不释放或微量释放,降低了传统给药方式对正常细胞的无差别损伤;当纳米药物载体利用 EPR 效应进入肿瘤组织区域后,由于较低的 pH 微环境会诱导其纳米结构发生改变,释放出药物(如光敏剂),从而提高了肿瘤组织区域及细胞内的药物含量,改善肿瘤的治疗效果,同时降低了对正常细胞的损伤。基于此方法,Liu 等^[9]将阳离子二苯丙氨酸($H\text{-Phe-Phe-NH}_2$ ·

HCl, CDP)、二肽 9-芴基甲氧基羰基-1-赖氨酸(Fmoc-1-Lys)与二氢卟吩(Ce6)混合,通过静电作用力、 π - π 堆叠力以及疏水作用力等,制备出了纳米尺度均一、对 pH 敏感的二肽杂化纳米颗粒(FCNPs)(如图 1 所示)。在生理条件下,FCNPs 的结构组分之一 Ce6 的羧基会质子化,减弱了其与 Fmoc-1-Lys 之间的静电力作用;同时,肿瘤细胞内的表面活性成分破坏了 Fmoc-1-Lys 与 Ce6 之间的疏水相互作用力,进而触发光敏剂释放,使药物具备选择性释放的能力。动物

实验结果表明,与单纯的光敏剂相比,FCNPs 纳米颗粒对 MCF7-荷瘤鼠的肿瘤抑制效果明显高于单纯 Ce6 光敏分子的抑制效果。

这种由二肽和光敏剂相互作用自组装的载体,通过改变光敏剂与二肽的含量或反应时间,可调节载体尺寸;同时通过静电力、 π 键堆叠作用、疏水作用等来负载药物,具有通用性强、负载效率高的特点。利用肿瘤的弱酸性环境破坏载体与光敏剂间的作用力,控制光敏剂释放,实现智能给药。

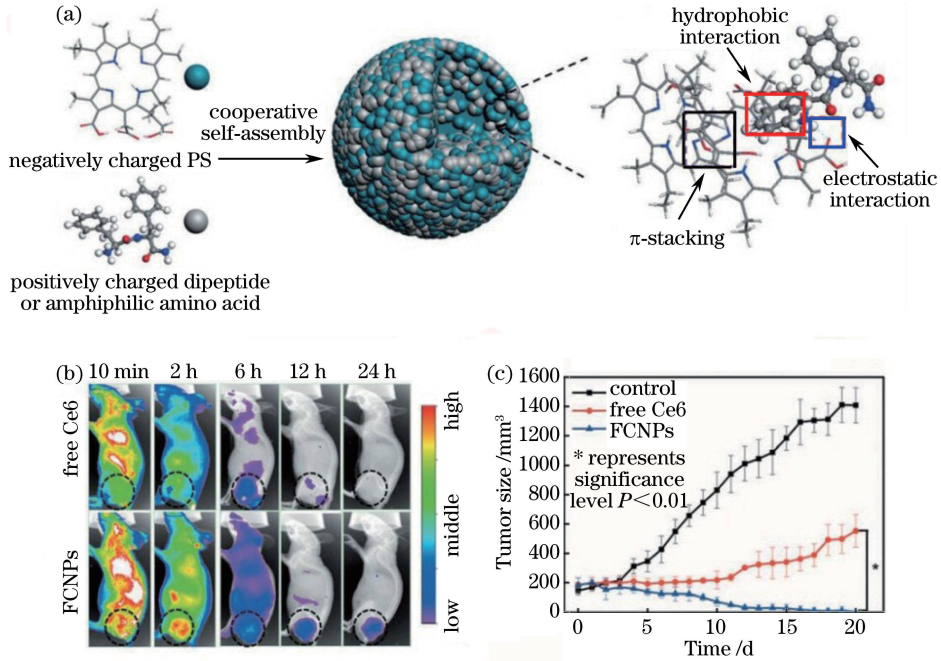


图 1 (a)通过两亲性二肽或氨基酸调节的自组装制备光敏纳米颗粒;(b)通过尾静脉注射 FCNPs 和游离 Ce6(相当于每千克 FCNs 中含有 4.0 mg Ce6)的 MCF7-荷瘤裸鼠在不同时间的全身荧光图像,黑色圆圈表示肿瘤部位;(c)测量肿瘤生长 20 d 的大小(每组小鼠数量 $n=4$)

Fig. 1 (a) Fabrication of photosensitive nanoparticles by amphiphilic dipeptide- or amino-acid- tuned self-assembly; (b) whole body fluorescence images of MCF7-tumor-bearing nude mice intravenously injected through a tail vein with FCNPs and free Ce6 (equivalent to 4.0 mg Ce6 per kilogram FCNs) at different times, black circles indicate tumor sites; (c) measured tumor size for 20 days growth (the number of mice in each group $n=4$)

5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)是光敏剂原卟啉 IX (PpIX)的前体,因具有无毒、体内代谢快等优点而被广泛使用^[10]。5-ALA 可通过细胞内血红素生物合成途径转化为 PpIX,而内生的 PpIX 不仅可以用于癌症的诊断及荧光成像,还可作为一种有效的光敏剂用于癌细胞的选择性杀伤。然而,5-ALA 难以透过细胞膜进入细胞,并且选择性差^[11-12]。因此,需要一种药物载体协助 5-ALA 绕过亲脂性屏障直接进入肿瘤细胞中,用于肿瘤的光动力治疗。大多数研究利用静电力将 5-ALA 负载于纳米载体表面,但是这种方式的非共价键作用力较弱,容易引起 5-ALA 在体内输送过程中过早释放,影响光动力治

疗效果^[13]。为此,Tong 等^[14]设计了一种 pH 双重响应的纳米载体,并将其用于肿瘤的选择性光动力治疗(如图 2 所示)。首先利用 α -环糊精(α -CD)与 5-ALA 通过胍键相连,然后再与亲水性聚乙二醇-穿膜肽共聚物自组装(PEG-CPP-R₆H₄)形成 5-ALA 纳米前药^[15]。其中,穿膜肽 CPP-R₆H₄ 具有一定的 pH 敏感性,在正常生理条件下不带电荷,可有效降低网状内皮系统对它的吞噬作用,而当其通过 EPR 效应在肿瘤部位富集时,肿瘤较低的 pH 微环境促使其电荷发生改变,使之带正电荷,促进带负电的肿瘤细胞对 5-ALA 纳米前药的摄取^[16-17]。与此同时,内吞后的 5-ALA 纳米前药进

入溶酶体中,其较低的 pH 导致 α -环糊精与 5-ALA 间的脲键断裂,释放出 5-ALA 光敏剂前体,5-ALA 再通过细胞内血红素生物合成途径转化为有活性的 PpIX 光敏剂,并在激光照射下用于肿瘤的光动力治疗,提高肿瘤光动力治疗的选择性,降低其对

正常组织细胞的损伤。这种通过 pH 控制穿膜肽 CPP-R₆H₄ 靶向能力与对 pH 敏感的脲键来控制光敏剂释放的 pH 双重响应的纳米载体,避免了光敏剂在血液循环系统过早释放,使其在微酸性的肿瘤部位智能定点释放。

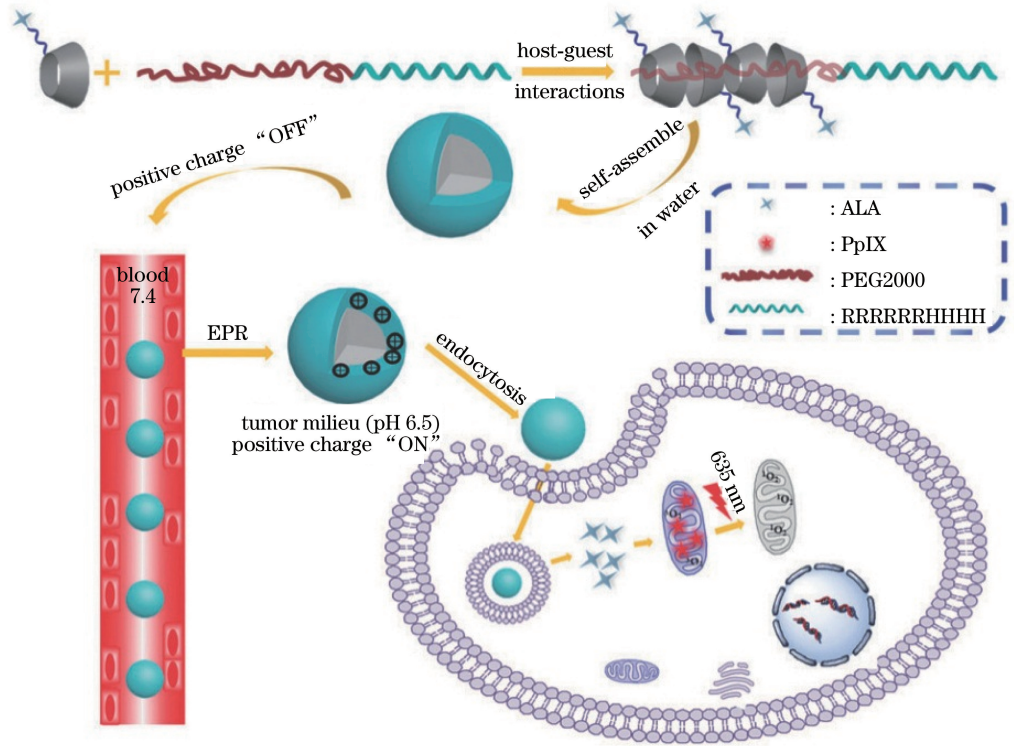


图 2 用于光动力治疗的 ALA 准聚轮烷前药胶束示意图

Fig. 2 Schematic of ALA pseudopolyrotaxane prodrug micelles for photodynamic therapy

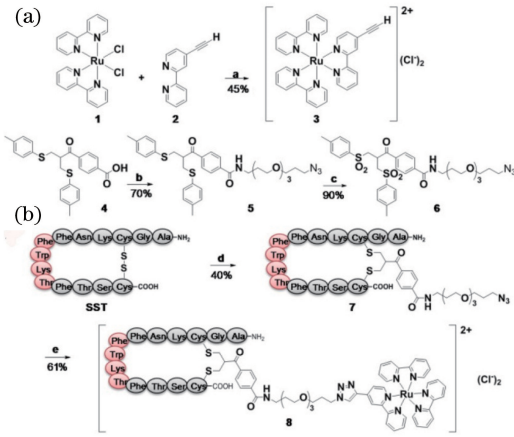
2.2 还原响应的智能化纳米载体

肿瘤组织中普遍存在的缺氧环境导致肿瘤细胞内部的谷胱甘肽(GSH)含量升高,其浓度大约是正常细胞内 GSH 的 4 倍^[18]。在生理条件下,GSH 浓度较低,不足以断裂二硫键,纳米载体可稳定存在,当纳米载体进入肿瘤细胞后,促使纳米药物的结构在肿瘤细胞内的较高还原性环境下发生变化,化学键断裂而释放药物,实现肿瘤的选择性治疗。其中,细胞内的 GSH、二价铁离子、半胱氨酸、溶酶体硫醇还原酶(GILT)等均具有还原性,可作为还原响应纳米药物载体的刺激因子^[19],利用其设计还原敏感的纳米药物载体。具备还原性敏感的化学键包括二硒键^[20-21]、二硫键^[22-24]、琥珀酰亚胺-硫醚键^[25]等。

McFarland 公司研制的钆(II)络合物 TLD-1433 已进入 I 期临床试验,其在光动力治疗中表现出了巨大的潜力^[26]。但钆聚吡啶复合物细胞的摄取率低,阻碍了其临床应用。Wang 等^[27]合成了一种钆络合物-靶向肽共轭复合物 Ru-SST8,如图 3 所

示。其中,生长抑素受体(SSTRs)亚型 2(SSTR2)在肿瘤细胞及肿瘤血管中高表达,并在纳摩尔范围显示出良好的亲和力^[28]。利用二硫键将 SST 与钆络合物 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 连接,可设计出具有 GSH 敏感的生长抑素受体靶向光动力治疗纳米材料^[29-31]。在生理条件下,二硫桥硫醚共轭物具有良好的稳定性,当靶向进入肿瘤细胞后,细胞内高浓度的 GSH 导致 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ -SST 解离,释放出 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$,在近红外光的照射下产生活性氧自由基,杀伤肿瘤细胞。这种纳米载体的生物相容性好,细胞摄取率高,以肿瘤细胞膜高表达的 SSTR 为靶点,使纳米载体富集于肿瘤细胞,对肿瘤细胞类型具有高选择性。随后,纳米载体上的硫醚键响应肿瘤细胞内的高浓度 GSH,双重靶向使光敏剂智能性释放,减少了药物在其他正常组织中的释放。

为了提高光动力治疗疗效,将其与化疗联合的肿瘤微环境响应纳米载体也被广泛研究。张文佳等^[32]制备了一种新型还原性响应纳米载体 ICG@



a: volume ratio of ethanol to water of 3:1, reflux of 3 h;
 b: HBTU, DIEA, DMF, overnight;
 c: oxone, volume ratio of MeOH to H₂O of 1:1, 24 h;
 d: 2 eq. TCEP for 0.5 h, then compound 6 for 24 h,
 50 mmol phosphate buffer pH 7.8;
 e: 2 eq. CuSO₄, 4 eq. Na ascorbate, H₂O, overnight

图 3 (a)通过二硫化物重新桥接和生物偶联合成试剂 6 (叠氮双磺);(b) SST 的功能化以获得 Ru-SST 缀合物 8(Ru-SST8)

Fig. 3 (a) Synthesis of the disulfide rebridging and bioconjugation reagent 6 (azide double sulfone); (b) functionalization of SST to receive Ru-SST conjugate 8 (Ru-SST8)

PEG-b-PCPTM,并将其用于肿瘤的选择性光动力协同化学治疗。其利用两步法合成两亲性喜树碱聚前药分子 PEG₄₅-b-PCPTM₁₈,再通过“自下而上”自组装,同时负载疏水性光敏剂吡啶管绿(ICG),形成了具有还原敏感的喜树碱聚前药两亲分子-光敏纳米药物(ICG@PEG-b-PCPTM)。在还原性 GSH 作用下,释放出化疗药物喜树碱;同时,释放出光敏剂 ICG 用于光动力治疗,实现化疗与光动力的联合治疗,表现出良好的肿瘤抑制效果。

2.3 酶敏感的智能纳米载体

在肿瘤组织细胞中存在各种生物酶,如基质金属蛋白酶、水解酶、蛋白酶、脂肪酶、糖苷酶等,这些酶在不同生理过程中发挥着重要作用^[33]。随着肿瘤的产生、发展及某些生物酶基因的异常高表达,一些酶的活性会发生改变^[34]。因此,可利用正常组织与肿瘤组织内酶的种类及其表达差异,制备具有酶响应的纳米药物载体,用于光动力治疗^[35]。Jang 等^[36]通过多肽两端将光敏剂与金纳米棒偶联,该多肽可被金属蛋白酶(MMP2)切割,制备得到 MMP2P-GNR 复合物(如图 4 所示)。在正常组织中,金纳米棒(GNR)的等离子体共振效应可有效猝灭光敏剂的荧光及光敏作用,降低其在血液循环中对正常组织细胞及血管等的毒副作用^[37]。当 MMP2P-GNR 纳米复合物通过 EPR 效应进入肿瘤

组织后,肿瘤间质内较高的基质金属蛋白酶(MMPs)有效切割肽段复合物 MMP2P 中的 GPLGVRG 序列,释放光敏剂,使光敏荧光和光敏活性恢复;同时,GNR 具有较高的光吸收系数,为常规有机染料的 10⁴~10⁶ 倍,可作为光热转换剂,在近红外激光照射下同时产生高热与 ROS,诱导肿瘤细胞凋亡、坏死^[38-39]。此纳米载体以具有光热作用的金纳米棒为载体,通过多肽偶联光敏剂,材料简单易制备,药物负载率高,仅在肿瘤组织内通过 MMPs 解除金纳米棒对光敏剂的抑制,使光动力学反应智能性地位于目标区域,有较高的选择性,联合光热治疗可提高肿瘤的杀伤效率。

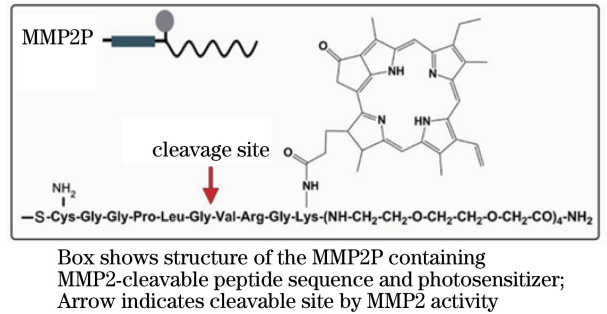
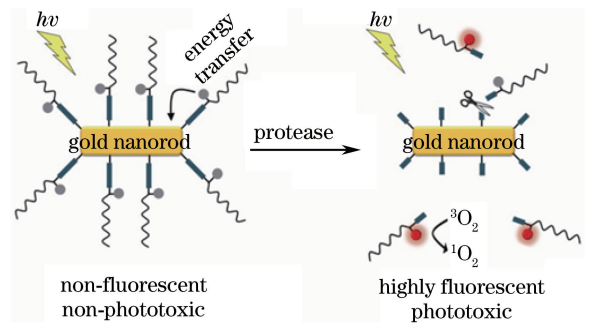


图 4 使用酶活化的光敏剂-金纳米棒共轭物(MMP2P-GNR) 荧光成像和光动力疗法的概念图

Fig. 4 A concept of enzyme activatable fluorescence imaging and photodynamic therapy using a photosensitizer-conjugated gold nanorod (MMP2P-GNR)

2.4 H₂O₂ 响应的智能纳米载体

在肿瘤组织中,癌细胞线粒体呼吸链或细胞膜 NADPH 氧化酶形成的超氧阴离子及过氧化物酶体增殖物激动剂活化增殖物激活受体(PPAR α)引起酯酰辅酶 A 氧化酶转录水平增加,导致 H₂O₂ 在细胞膜、线粒体、过氧化物酶体多位点产生,使肿瘤细胞内的 H₂O₂ 高于正常细胞^[40-41]。Zhang 等^[42]利用苯基介孔二氧化硅(APMs)包埋金纳米棒(AuNR)形成核-壳型纳米结构(如图 5 所示),将 [Eu(HTHA)₃(phen)]与亚甲基蓝(MB)利用疏水

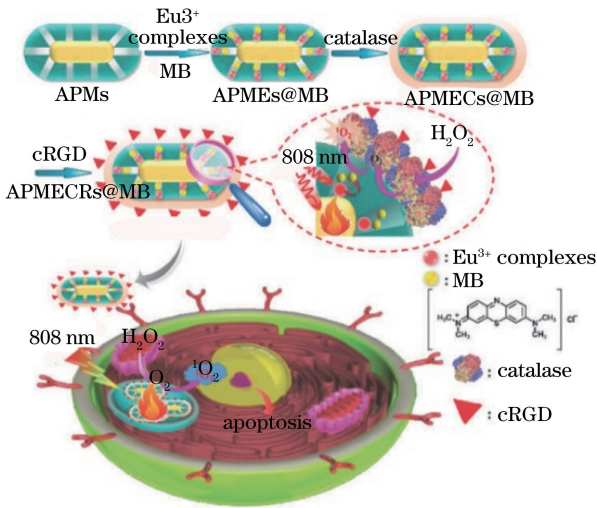


图 5 APMECR@MB NCs 逐步组装的简化过程及其协同光动力治疗/光热治疗作用的机制

Fig. 5 Simplified representation of a stepwise assembly process of final APMECR@MB NCs and the synergistic PDT/PTT mechanism of their action

作用及 π 堆叠作用负载于 APMs, 形成 APME@MB 纳米结构。其中, MB 为光敏剂, 其单线态氧产率较高。通过比较紫外光谱可知, MB 分子在 APM 介孔内形成了二聚体, 提高了 MB 的稳定性。过氧化氢酶与 APME@MB 表面的氨基交联作为堵孔剂, 防止 $[\text{Eu}(\text{HTHA})_3(\text{phen})]$ 与 MB 泄漏, 维持 APM 的稳定性。为了提高 APMEC@MB 的靶向作用, 在 APMEC@MB 表面修饰靶向环肽 (cRGD)。当 APMECRs@MB 进入肿瘤组织后, 肿瘤细胞产生的内源性 H_2O_2 能清除堵塞 APM 介孔的过氧化氢酶, 促进 $[\text{Eu}(\text{HTHA})_3(\text{phen})]$ 和 MB 释放。在 808 nm 近红外光照射下, $[\text{Eu}(\text{HTHA})_3(\text{phen})]$ 络合物通过发光共振能量转移 (LRET) 效应激活光敏剂 MB, 产生 ROS。内源性 H_2O_2 与 APMECR@MB 的过氧化氢酶反应生成 O_2 , 可进一步提高 APMECRs@MB 对肿瘤细胞的光动力治疗效果。与传统的纳米载体相比, 此纳米载体除了具有多孔结构, 能负载大量药物外, 还有以下几点优势: 1) APM 的介孔通道具有超疏水性, 可改善负载药物的生物稳定性, 用过氧化氢酶包被的 APM 能抑制 MB 过早泄漏, 并且改善 MB 的水溶性; 2) Eu^{3+} 络合物的发光特性导致能量长期转移到 MB, 进而激发 MB 的光动力效应, 同时 MB 分子与 Eu^{3+} 相互结合, 促进了它们之间的 LRET 效应, 使 ROS 生成增加; 3) 肿瘤微环境中过量的 H_2O_2 与堵孔剂过氧化氢酶反应产生大量 O_2 , 改善氧依赖

性光动力治疗对缺氧性肿瘤的疗效, 同时促进 MB 的释放; 4) cRGD 连接在 APMEC@MB 表面, 提高了纳米载体的靶向性。上述几种优点使光敏剂能在肿瘤细胞内智能性释放, 实现选择性治疗。

2.5 核酸响应的智能纳米载体

为满足生长需要, 肿瘤细胞内的某些蛋白质高表达会导致肿瘤细胞内的 DNA 或信使 RNA (mRNA) 转录水平提高。利用这一特征, 设计了针对肿瘤细胞内特定 DNA 或 mRNA 序列的纳米药物载体系统, 以实现药物选择性递送, 提高治疗效果。Wu 等^[43] 制备了以量子点为核心, 通过修饰有光敏剂 Ce6 及猝灭基团 BHQ3 的分子信标, 设计出了靶向 mRNA 刺激响应的光动力诊疗探针 TMB (如图 6 所示)。其中: 修饰有光敏剂 Ce6 及猝灭基团 BHQ3 的分子信标具有发卡结构, 导致 Ce6 荧光及光敏活性猝灭; 同时, 发夹 DNA 末端的碲化镉量子点 (QD) 与 BHQ3 距离相对较短 (4.0 nm), 可被 BHQ3 通过荧光能量共振转移作用猝灭; 进入肿瘤细胞后, 发卡结构与目标 mRNA 基因序列互补配对, 使 Ce6 荧光及 QD 荧光恢复, 在激光照射下, QD 利用荧光能量共振转移 (FRET) 效应提供光敏剂跃迁至单线态激发态所需的能量, 产生 ROS, 用于杀伤肿瘤细胞, 提高光敏剂对肿瘤细胞的靶向性治疗作用。此纳米载体利用新颖的肿瘤细胞 mRNA 为靶向, 通过分子信标与 mRNA 结合后结构的变化, 智能性地恢复肿瘤细胞内 Ce6 的光敏性及荧光, 实现对肿瘤细胞的光动力治疗与成像。

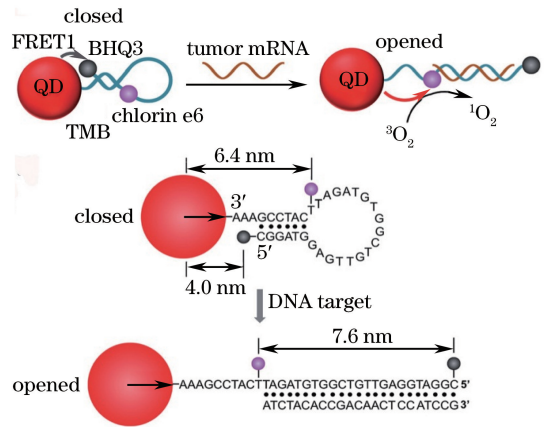


图 6 TMB 示意图。(a) 封闭和开放式 TMB 的 FRET 模式; (b) 发夹 DNA 序列和每个 FRET 对的分离距离
Fig. 6 Schematic of TMB. (a) FRET mode of TMB in the closed and opened forms; (b) hairpin DNA sequence and the separation distance of each FRET pair

2.6 ROS 响应的智能纳米载体

ROS 是机体氧化应激时产生的主要分子,主要在线粒体呼吸链中产生,在生理和病理过程中都起着重要的作用。正常生理条件下,生物体内的 ROS 保持在较低的平衡水平,维持着细胞正常的生长凋亡,而肿瘤组织中的 ROS 水平高于正常细胞^[44-45]。因此,可以利用肿瘤组织与正常细胞 ROS 的差异,设计 ROS 响应的纳米药物载体。目前,国内外已报道的 ROS 敏感材料有聚丙烯-硫化物、含硒嵌段复合物、聚硫醚酮、脯氨酸低聚物、聚酮缩硫醇等^[46]。Kim 等^[47]制备了巨噬细胞靶向纳米粒子 MacTNP (如图 7 所示),它是 Ce6 与透明质酸(HA)的共轭物,MacTNP 因共轭光敏剂之间的自猝灭效应而无光毒性。多糖类物质,如透明质酸,能被 ROS 解聚^[48],细胞中过量的 ROS 通过切割透明质酸使光敏剂释放,产生单线态氧。MacTNP 通过 ROS 促进光敏剂释放,而光敏剂释放后的光动力治疗效应又会产生 ROS,从而进一步提高光动力治疗的疗效。ROS 响应的纳米载体的最大优势在于触发光敏剂释放,光敏剂的光动力效应能产生 ROS,智能地放大其触发效应,使光敏剂的释放达到最大,增加其在肿瘤部位的富集。

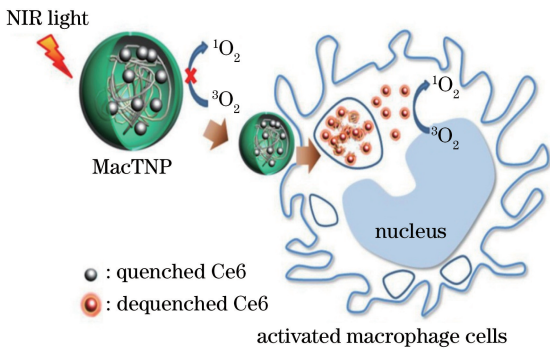


图 7 用于巨噬细胞靶向荧光成像和光动力学治疗的可激活的纳米材料示意图

Fig. 7 A schematic of activatable nano-photo medicine for macrophage-targeted fluorescence imaging and subsequent photodynamic therapy

Yue 等^[49]考虑到由光敏剂产生的 ROS 不仅能用于光动力疗法,而且能用于切割聚酮缩硫醇类物质释放药物,实现光动力治疗与化疗相结合。因此,他们制备出了一种多功能 Ce6-CPT-UCNPs 纳米载体(如图 8 所示)。其中,mPEG-COOH、光敏剂 Ce6 和 ROS 可切割的聚酮缩硫醇-喜树碱共轭物负载于上转换材料(UCNP)上。当用 980 nm 激光照射时,UCNP 可将 980 nm 光转换为 645~675 nm 光,进

而激活 Ce6 产生 ROS,用于杀伤肿瘤细胞,并切割聚酮缩硫醇-喜树碱共轭物释放化疗药物喜树碱。此载体利用光敏剂产生的 ROS 切割对 ROS 敏感的聚酮缩硫醇,智能性地控制化疗药物在肿瘤部位的释放,减少了药物的毒副作用。

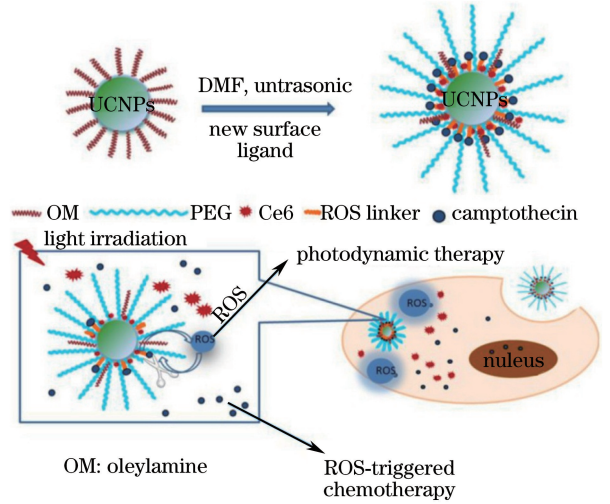


图 8 Ce6-CPT-UCNPs 制备示意图以及光调节的 ROS 激活 Ce6-CPT-UCNPs 的原理
Fig. 8 Schematic illustration of the preparation of Ce6-CPT-UCNPs and concept of the light-regulated ROS-activated Ce6-CPT-UCNPs

2.7 多重响应的智能纳米载体

在抗肿瘤药物递送研究中,多重刺激响应型纳米药物载体系统(如 pH-ROS 双敏感、pH-GSH 双敏感、ROS-MMP 双敏感、pH-ROS-GSH 多重敏感)等能提高光敏剂在肿瘤部位的靶向传递,并控制药物释放。何玉玲^[50]设计了一种可以在肿瘤微环境中实现双响应的聚丙烯硫醚-聚乙烯亚胺-多肽-肝素(PPS-PEI-Peptide-HP)聚合物胶束。其中:PPS 是活性氧响应的聚合物,在肿瘤细胞内高浓度的 GSH 条件下由疏水相转变成亲水相,促进药物释放;Peptide 是具有 MMP-2 切割位点的多肽,肿瘤细胞内高表达的 MMP-2 能切割 Peptide 释放 HP,脱落的 HP 和 PEI 电荷竞争导致 DNA 释放。PPS-PEI-Peptide-HP 纳米胶束利用肿瘤细胞中高浓度的谷胱甘肽(GSH)和基质金属蛋白酶-2(MMP-2),通过其独特的相变和酶裂解行为,能智能性地在肿瘤部位释放药物和基因。

此外,Zhang 等^[51]合成了一种 GSH 与 pH 双重响应的纳米诊疗探针 AQ4N-Cu(II)-Apt Ce6-GNPs,如图 9 所示。TLS11a Aptamer 是肝细胞癌(HCC)的特异性靶向适配体,在其 5'末端偶联光敏

剂 Ce6, 利用 Au-S 键在 3' 末端偶联金纳米颗粒 (GNPs), 同时利用 Cu(II) 与 3' 端(GA)₁₀ 碱基的配位作用负载 AQ4N 前药。在正常生理条件下, Ce6 的荧光及其 ROS 会因 GNPs 的共振能量转移效应 (RET) 而猝灭; 在肝癌细胞中, 由于较高的 GSH 环境, 导致 Au-S 键断裂释放出适配体, 此时 Ce6 的荧光和 ROS 恢复, 实现近红外成像与光动力治疗作用。此外, 由于肿瘤微酸性环境引起“Aptamer-Cu(II)”和“Cu(II)-AQ4N”的配位键断裂而释放出 AQ4N 与 Cu(II) 离子, 而带正电的 Cu(II) 进一步诱导带负电的 GNPs 聚集用于光热治疗; 同时, AQ4N 是拓扑异构酶 II 抑制剂, 它在有氧条件下显

示出较低的细胞毒性, 当进入肿瘤组织内部后, 其通过光动力治疗加深肿瘤的乏氧微环境, 促使 AQ4N 进一步向细胞毒性药物 AQ4 转化, 提高肿瘤的化疗效果, 实现程序化、协同增强肿瘤光动力治疗的目的。此纳米载体药物结合位点多, 药物负载率高, 由肿瘤细胞内高浓度的 GSH 与弱酸性环境共同控制药物的释放, 极大提高了其靶向释放能力。最终, 此纳米药物载体在肿瘤细胞内高浓度 GSH 下通过单次激光照射激发基于 Ce6 的光动力治疗, 同时肿瘤弱酸性微环境智能性触发 Cu(II)、AQ4N 的释放, 分别发挥光热治疗、化疗的作用, 实现光热治疗、光动力治疗、化疗的协同治疗。

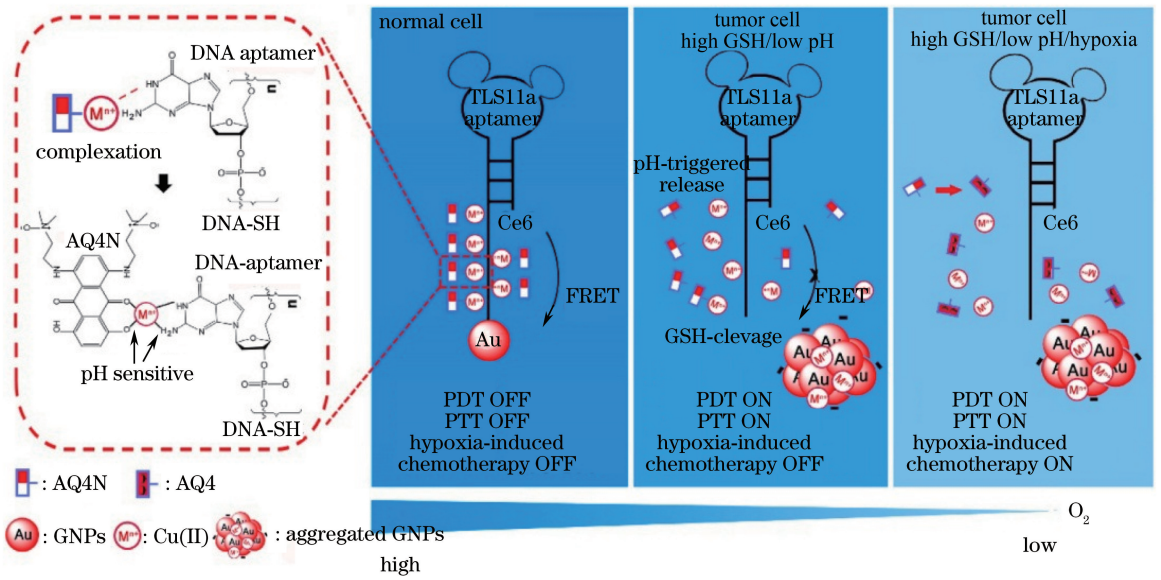


图 9 AQ4N-Cu(II)-Apt Ce6-GNPs 的制备及功能示意图

Fig. 9 Schematic of the preparation and functional principle of AQ4N-Cu(II)-Apt Ce6-GNPs

3 总结与展望

光动力治疗是新型的微创肿瘤光学治疗, 其具有低免疫原性、低成本、局部选择性等特点, 对肿瘤的治疗具有一定的指导意义, 然而实体瘤内部的肿瘤微环境因素导致光动力治疗效果下降, 阻碍了光动力治疗的临床发展及应用。近年来, 基于肿瘤微环境响应的智能纳米药物载体系统, 如 pH 响应型纳米载体、氧化还原响应型纳米载体、酶响应型纳米载体、活性氧响应型纳米载体、mRNA 型纳米载体、H₂O₂ 型纳米载体, 能有效解决传统光敏剂在治疗过程中表现出的光敏剂活性低、对正常组织的光敏毒性高、药物血液半衰期短、疏水性、稳定性差、肿瘤选择性低等问题, 有效地提高了肿瘤治疗的选择性及有效性。但智能响应的光动力纳米探针的发展

仍然面临着一定问题, 如组分复杂、结构稳定性差、非药物组分残留率高、代谢差、ROS 产率低、激发波长短及治疗深度限制等。理想的光动力治疗纳米药物载体应符合以下标准: 1) 高药物负载效率; 2) 多重刺激响应, 程序性、协同发挥治疗作用; 3) 具有良好的主动靶向功能; 4) 具备诊断与治疗功能。在未来抗肿瘤药物递送的研究中, 可通过提高近红外光激发波长, 或利用上转换材料、双光子及 X 线激发等方式解决治疗深度等问题; 也可利用携带氧气或产氧的物质进入肿瘤区域解决肿瘤乏氧问题, 或利用乏氧化疗药物与光敏剂协同治疗, 提高对肿瘤的抑制效果与选择性, 充分发挥光动力治疗与其他治疗方式的协同效应; 同时, 利用多重刺激响应型纳米药物载体系统解决传统光敏剂在肿瘤靶向传递上的问题, 为更加精准有效的肿瘤治疗提供新方向。

参 考 文 献

- [1] Yang M, Xing L Y, Gao W D, *et al.* Dose-effect relationship of ZnPc-PDT on tumor cells *in vitro* [J]. Chinese Journal of Lasers, 2017, 44(3): 0307001.
杨曼, 邢力允, 高卫栋, 等. 锌酞菁体外光动力学疗法体外抗肿瘤细胞量效关系 [J]. 中国激光, 2017, 44(3): 0307001.
- [2] Sazgarnia A, Montazerabadi A R, Bahreyni-Toosi M H, *et al.* *In vitro* survival of MCF-7 breast cancer cells following combined treatment with ionizing radiation and mitoxantrone-mediated photodynamic therapy [J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2013, 10(1): 72-78.
- [3] Huang Q, Ou Y S, Tao Y, *et al.* Apoptosis and autophagy induced by pyropheophorbide- α methyl ester-mediated photodynamic therapy in human osteosarcoma MG-63 cells [J]. Apoptosis, 2016, 21(6): 749-760.
- [4] Chatterjee D K, Fong L S, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60(15): 1627-1637.
- [5] Vemula P K, Cruikshank G A, Karp J M, *et al.* Self-assembled prodrugs: An enzymatically triggered drug-delivery platform [J]. Biomaterials, 2009, 30(3): 383-393.
- [6] Wang S M, Wang J, Liu J, *et al.* Fluorescence intensity and photon dynamic treatment enhancement of Au NBPs with different aspect ratios to photosensitizer [J]. Chinese Journal of Lasers, 2017, 44(6): 0607003.
王诗森, 王晶, 刘军, 等. 不同长径比金纳米双锥对光敏剂荧光和光动力学疗法效果的增强 [J]. 中国激光, 2017, 44(6): 0607003.
- [7] Li S, Su Z, Sun M, *et al.* An arginine derivative contained nanostructure lipid carriers with pH-sensitive membranolytic capability for lysosomolytic anti-cancer drug delivery [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2012, 436(1/2): 248-257.
- [8] Zhang Y H, Guan Q X, Lü S W, *et al.* Research progress and application of nanometer carrier transmission anticancer drugs targeted the tumor microenvironment [J]. Journal of Modern Oncology, 2014, 22(12): 2997-3001.
张艳惠, 管庆霞, 吕邵娃, 等. 纳米载体传递抗肿瘤药物在肿瘤微环境的靶向性及应用研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(12): 2997-3001.
- [9] Liu K, Xing R, Zou Q, *et al.* Simple peptide-tuned self-assembly of photosensitizers towards anticancer photodynamic therapy [J]. Angewandte Chemie, 2016, 55(9): 3036-3039.
- [10] Ke G, Zhu Z, Wang W, *et al.* A cell-surface-anchored ratiometric fluorescent probe for extracellular pH sensing [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6(17): 15329-15334.
- [11] Ma X, Qu Q, Zhao Y. Targeted delivery of 5-aminolevulinic acid by multifunctional hollow mesoporous silica nanoparticles for photodynamic skin cancer therapy [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(20): 10671-10676.
- [12] Aggelidou C, Theodossiou T A, Goncalves A R, *et al.* A versatile δ -aminolevulinic acid (ALA)-cyclodextrin bimodal conjugate-prodrug for PDT applications with the help of intracellular chemistry [J]. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2014, 10(1): 2414-2420.
- [13] Zhang Z, Wang S, Xu H, *et al.* Role of 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer [J]. Journal of Biomedical Optics, 2015, 20(5): 051043.
- [14] Tong H, Wang Y, Li H, *et al.* Dual pH-responsive 5-aminolevulinic acid pseudopolyrotaxane prodrug micelles for enhanced photodynamic therapy [J]. Chemical Communications, 2016, 52(20): 3966-3969.
- [15] Wang Y, Wang H, Chen Y, *et al.* Biomimetic pseudopolyrotaxane prodrug micelles with high drug content for intracellular drug delivery [J]. Chemical Communications, 2013, 49(64): 7123-7125.
- [16] Jin E, Zhang B, Sun X, *et al.* Acid-active cell-penetrating peptides for *in vivo* tumor-targeted drug delivery [J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(2): 933-940.
- [17] Kondo E, Saito K, Tashiro Y, *et al.* Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems [J]. Nature Communications, 2012, 3(1): 951.
- [18] Etrych T, Subr V, Laga R, *et al.* Polymer conjugates of doxorubicin bound through an amide and hydrazone bond: Impact of the carrier structure onto synergistic action in the treatment of solid tumours [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 58: 1-12.
- [19] Rikkou M D, Patrickios C S. Polymers prepared using cleavable initiators: Synthesis, characterization and degradation [J]. Progress in Polymer Science, 2011, 36(8): 1079-1097.
- [20] Ma N, Li Y, Xu H, *et al.* Dual redox responsive assemblies formed from diselenide block copolymers [J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(2): 442-443.

- [21] Zeng X, Zhou X, Li M, *et al.* Redox poly (ethylene glycol)-b-poly (L-lactide) micelles containing diselenide bonds for effective drug delivery [J]. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 2015, 26(9): 234.
- [22] Chen W, Zheng M, Meng F, *et al.* *In situ* forming reduction-sensitive degradable nanogels for facile loading and triggered intracellular release of proteins [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(4): 1214-1222.
- [23] Lin D, Jiang Q, Cheng Q, *et al.* Polycation-detachable nanoparticles self-assembled from mPEG-PCL-g-SS-PDMAEMA for *in vitro* and *in vivo* siRNA delivery[J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(8): 7746-7757.
- [24] Zhang A, Zhang Z, Shi F, *et al.* Redox-sensitive shell-crosslinked polypeptide-block-polysaccharide micelles for efficient intracellular anticancer drug delivery [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2013, 13(9): 1249-1258.
- [25] Baldwin A D, Kiick K L. Reversible maleimide-thiol adducts yield glutathione-sensitive poly (ethylene glycol)-heparin hydrogels [J]. *Polymer Chemistry*, 2013, 4(1): 133-143.
- [26] Mari C, Pierroz V, Ferrari S, *et al.* Combination of Ru(II) complexes and light: New frontiers in cancer therapy [J]. *Chemical Science*, 2015, 6(5): 2660-2686.
- [27] Wang T, Zabarska N, Wu Y, *et al.* Receptor selective ruthenium-somatostatin photosensitizer for cancer targeted photodynamic applications [J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(63): 12552-12555.
- [28] Sun L C, Coy D H. Somatostatin receptor-targeted anti-cancer therapy [J]. *Current Drug Delivery*, 2011, 8(1): 2-10.
- [29] Tao W, Ng D Y W, Wu Y, *et al.* Bis-sulfide bioconjugates for glutathione triggered tumor responsive drug release [J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(9): 1116-1118.
- [30] Brocchini S, Balan S, Godwin A, *et al.* PEGylation of native disulfide bonds in proteins [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(5): 2241-2252.
- [31] Brocchini S, Godwin A, Balan S, *et al.* Disulfide bridge based PEGylation of proteins [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60(1): 3-12.
- [32] Zhang W J, Hu X L. Tumor photodynamic and chemical combination therapy based on ICG loaded camptothecin polyprodrug nanoparticles [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2016, 25(6): 520-522.
张文佳, 胡祥龙. 喜树碱聚前药纳米粒子包埋吡啶管绿用于化疗与光动力联合抗肿瘤治疗 [J]. *激光生物学报*, 2016, 25(6): 520-522.
- [33] Amici A, Levine R L, Tsai L, *et al.* Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(6): 3341-3346.
- [34] Ghadiali J E, Stevens M M. Enzyme-responsive nanoparticle systems [J]. *Advanced Materials*, 2010, 20(22): 4359-4363.
- [35] Sun H, Benjaminsen R V, Almdal K, *et al.* Hyaluronic acid immobilized polyacrylamide nanoparticle sensors for CD44 receptor targeting and pH measurement in cells [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2012, 23(11): 2247-2255.
- [36] Jang B, Choi Y. Photosensitizer-conjugated gold nanorods for enzyme-activatable fluorescence imaging and photodynamic therapy [J]. *Theranostics*, 2012, 2(2): 190-197.
- [37] Almog N, Ma L, Schwager C, *et al.* Consensus micro RNAs governing the switch of dormant tumors to the fast-growing angiogenic phenotype [J]. *Plos One*, 2012, 7(8): e44001.
- [38] Dulkeith E, Ringler M, Klar T A, *et al.* Gold nanoparticles quench fluorescence by phase induced radiative rate suppression [J]. *Nano Letters*, 2005, 5(4): 585-589.
- [39] Jain P K, Lee K S, El-Sayed I H, *et al.* Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110(14): 7238-7248.
- [40] Zhang Y, Shen T T, Zhang H L, *et al.* A multifunctional nanocomposite for luminescence resonance energy transfer-guided synergistic monitoring and therapy under single near infrared light [J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(27): 4880-4883.
- [41] Wang L, Liu Y, Li W, *et al.* Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: Implications for cancer therapy [J]. *Nano Letters*, 2011, 11(2): 772-780.
- [42] Zhang Y, Shen T T, Kirillov A M, *et al.* NIR light/ H_2O_2 -triggered nanocomposites for a highly efficient and selective synergistic photodynamic and photothermal therapy against hypoxic tumor cells [J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(51): 7939-7942.
- [43] Wu D, Song G, Li Z, *et al.* A two-dimensional molecular beacon for mRNA-activated intelligent cancer theranostics [J]. *Chemical Science*, 2015, 6(7): 3839-3844.

- [44] Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003, 417(1): 3-11.
- [45] Gupta S C, Hevia D, Patchva S, *et al.* Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: The roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2012, 16(11): 1295-1322.
- [46] Liu Y H, Zhou J P, Huo M R. Advances in the tumor microenvironment-responsive smart drug delivery nanosystem [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2016, 47(2): 125-133.
刘艳红, 周建平, 霍美蓉. 肿瘤微环境响应型智能纳米药物载体的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(2): 125-133.
- [47] Kim H, Kim Y, Kim I H, *et al.* ROS-responsive activatable photosensitizing agent for imaging and photodynamic therapy of activated macrophages[J]. Theranostics, 2013, 4(1): 1-11.
- [48] Hamblin M R, Miller J L, Rizvi I, *et al.* Pegylation of a chlorin(e6) polymer conjugate increases tumor targeting of photosensitizer [J]. Cancer Research, 2001, 61(19): 7155-7162.
- [49] Yue C, Zhang C, Alfranca G, *et al.* Near-infrared light triggered ROS-activated theranostic platform based on Ce6-CPT-UCNPs for simultaneous fluorescence imaging and chemo-photodynamic combined therapy [J]. Theranostics, 2016, 6(4): 456-469.
- [50] He Y L. Environment-responsive nanocarriers for drug and gene delivery to cancer cells[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2013.
何玉玲. 肿瘤微环境响应性纳米载体用于药物和基因输送的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2013.
- [51] Zhang D, Zheng A, Li J, *et al.* Smart Cu (II)-aptamer complexes based gold nanoplatforam for tumor micro-environment triggered programmable intracellular prodrug release, photodynamic treatment and aggregation induced photothermal therapy of hepatocellular carcinoma[J]. Theranostics, 2017, 7 (1): 164-179.