

基于二维碳化钛(MXene)的光热/化疗协同治疗纳米试剂的构建及其光热效应研究

付格格, 卢扬, 潘嘉林, 李旭, 王晨光, 刘晓敏*, 卢革宇

吉林大学电子科学与工程学院集成光电子学国家重点实验室, 吉林 长春 130012

摘要 光热治疗以其无创性、非侵入性、副作用小等特点受到了广泛关注。二维碳化钛(MXene)作为一种新型纳米材料,具有优异的物理和化学性能,其中包括良好的光热效应。本课题组通过静电吸附作用构建了基于MXene的光热/化疗协同治疗纳米试剂,该纳米试剂具有优异的消光系数[24.05 L/(g·cm)]以及出色的光热转效率(31.34%)。体外细胞实验结果表明该纳米对HepG2细胞起到了良好的抑制效果,经其治疗后的细胞存活率仅为21.09%。

关键词 医用光学; 光热治疗; MXene; 化疗; 近红外光; 纳米材料

中图分类号 TB34;R318.51 **文献标志码** A

DOI: 10.3788/CJL221211

1 引言

传统的癌症治疗手段有手术治疗、放疗及化疗,但它们的副作用很明显,例如:手术治疗具有一定风险,并且术后易产生一系列不良反应^[1];放疗的强射线会对体内正常细胞和皮肤表面产生伤害;化疗过程中的大量抗癌药物会使体内的肿瘤细胞产生抗体^[2]。光热治疗以其无创性^[3]、精准性、副作用小等优点引起了国内外的极大关注^[4]。光热治疗^[5]是将具有较高光热转换效率的光热剂注入生物体内部,光热剂在肿瘤组织附近聚集,在外部光源的照射下,光热剂吸收光能并将其转化为热能^[6],从而杀死癌细胞的一种治疗方法。纳米级光热剂经静脉注射后由于实体瘤的高通透性和滞留效应^[7](EPR)会在肿瘤处富集。选择对生物组织穿透性较好的近红外光^[8-9](NIR,波长为700~980 nm)照射肿瘤,光热剂会将光能转化为热能,使肿瘤局部迅速升温,并保持温度,利用高温对肿瘤细胞造成不可逆的损伤^[10]。

理想的光热剂应具有低毒性,并且在NIR窗口具有较强的吸收和较高的光热转换效率^[11]。近些年,随着纳米技术的快速发展,大量纳米材料展现出了作为光热剂的潜力。目前,光热剂主要分为两大类:无机纳米材料和有机纳米材料。无机纳米材料主要包括贵金属、碳基材料、钽纳米片材料^[12]等,而有机光热剂^[13]则主要包括近红外染料^[14]、卟啉脂质体^[15]和高分子聚合物^[16]等。两种材料各有千秋,比如无机光热剂具有更

高的光热转换效率和光热稳定性,而有机光热剂在生物降解性和生物相容性方面更胜一筹。本研究选择无机材料二维碳化钛MXene作为光热转换剂。MXene是一种新型的二维纳米材料^[17],具有优异的物理和化学性能,在纳米医学中得到了广泛应用^[18]。这种新型的二维材料MXene是通过剥离MAX陶瓷相中层状三元碳化物的A元素获得的^[19]。MAX相中的M是指过渡金属,如Sc、Ti、Zr、V等,X是碳(C)或氮(N),而A则主要是指元素周期表中的第Ⅲ、第Ⅳ族元素^[20]。选择MXene作为光热转换剂主要是因为其具有亲水性^[21]、光热转换效率高、生物相容性优异^[22]、二维表面积大^[23]等优点。

然而,细胞在高温下会启动自我保护机制,促使癌细胞激活其抗凋亡程序,以抵抗高温^[24]。为了减弱耐热性,可以提高光热转换剂浓度或照射功率,或者进行反复光照^[25],但这些方法可能会引起剂量依赖性毒性、炎症等不可逆伤害,威胁附近的正常细胞和健康组织^[26]。另一种策略就是将光热疗法与其他不同机制的治疗模式结合,例如与光动力疗法、化疗、基因疗法和免疫疗法结合,或者将多种治疗方法结合起来,发挥不同方法协同抗癌的巨大潜力^[3]。

槲皮素是一种广泛存在于绿色瓜果蔬菜中的天然黄酮类化合物。根据以往的报道,槲皮素具有抗菌、抗氧化等多种生物活性,而且对心血管疾病、风湿性疾病等^[27]具有一定的治疗效果。此外,槲皮素也是一种天然的毒副作用较低的抗癌药物,对多种癌细胞的增殖

收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-09-27; 录用日期: 2022-10-10; 网络首发日期: 2022-10-20

基金项目: 国家自然科学基金(61875191,U2003127,62171194,11874355,21902057)、吉林省自然科学基金(20210101380JC)

通信作者: *xiaominliu@jlu.edu.cn

均具有抑制作用,并可以诱导癌细胞凋亡^[28]。但是,槲皮素的水溶性极差,且生物利用度较低,从而极大地限制了它的广泛应用。

本课题组构筑了基于MXene的光热治疗与化疗协同的纳米试剂,并探究了它的光热效应。本课题组选择槲皮素作为抗癌药物,并利用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)与槲皮素发生络合反应来有效改善槲皮素的胶体稳定性。整体设计思路如下:将MXene进行表面改性使其表面带正电,然后将带负电的经过修饰的槲皮素通过静电吸附^[28]作用复合到MXene表面,构建光热/化疗协同治疗的纳米试剂。本文从细胞层面探究该纳米试剂+光照治疗相较于单一治疗方法在抗癌效果上的提高,选取HepG2肝癌细胞作为模型,分别设置组别,进行同等条件下的光热治疗。该纳米试剂在外部808 nm光照射下将光能转化为热能,使癌细胞快速升温,并释放抗癌药物槲皮素,槲皮素协同光热治疗对癌细胞的增殖过程进行抑制,实现光热/化疗协同杀死癌细胞,使治疗效果进一步提升。

2 材料制备及实验方法

2.1 MXene的制备

MXene的制备流程如下:1)将15 mL盐酸(HCl,质量分数为36%)缓慢加入5 mL去离子水中配制浓度为9 mol/L的盐酸溶液,称取1 g氟化锂(LiF)粉末并将其加入到上述配制的盐酸溶液中,搅拌40 min使粉末完全溶解;2)称取1 g钛碳化铝(Ti_3AlC_2)晶体粉末,将其缓慢加入到混合溶液中,在45 °C环境下搅拌24 h,接着用去离子水与乙醇进行交替洗涤,直至离心得到的上清液的pH值为5~6,收集最后一次离心产物——黑色湿沉淀(该沉淀是多层碳化钛 Ti_3C_2);3)向得到的沉淀中加入40 mL无水乙醇,在200 W功率下进行70~110 min的水浴超声,使多层 Ti_3C_2 聚集体变为大块单层,然后用去离子水进行多次反复洗涤,使最终的沉淀溶解在去离子水中;4)用细胞粉碎机对溶液进行超声处理,并进行离心提纯,收集上清液,将其作为纳米片胶体分散液;5)在低温下烘干5 mL胶体分散液,得到纳米片固体粉末(称量固体粉末,可以得到胶体分散液的质量浓度)。

2.2 MXene@Qu的制备

称取2 mg槲皮素(Qu)粉末,将其溶于2 mL无水乙醇中,制成1 mg/mL的槲皮素溶液;取出适量槲皮素溶液并将其加入溶有50 mg聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的5 mL去离子水中,搅拌直至溶液变为淡黄色;然后加入经聚丙烯胺盐酸盐(PAH)表面改性的MXene水溶液,搅拌,获得MXene@Qu复合物水溶液。

2.3 光热性能测试

2.3.1 MXene水溶液的光热效应测试

取100 μ L质量浓度分别为0,20,40,60,80,100 μ g/mL的MXene水溶液置于96孔板中(隔孔放置),将96孔

板上锡箔纸,在室温下静置10 min,以保证所有组别样品的起始温度基本一致。采用激发功率密度为1 W/cm²的808 nm近红外光照射不同质量浓度的MXene水溶液,用红外热成像仪记录5 min内溶液的温度变化情况,以分析不同质量浓度的MXene水溶液在相同激发功率密度下的光热效应。另外,取5组100 μ L相同质量浓度的MXene水溶液,采用激发功率密度分别为0.25,0.5,0.75,1,1.5 W/cm²的808 nm近红外光进行照射,利用红外热成像仪记录5 min内各组溶液的温度变化,以分析MXene水溶液在不同激发功率密度下的温度变化趋势。

2.3.2 MXene@Qu复合纳米材料的光热稳定性测试

取100 μ L质量浓度为100 μ g/mL的MXene@Qu溶液置于96孔板中(隔孔放置),用激光功率密度为1 W/cm²的808 nm近红外光照射MXene@Qu溶液,照射时长为3 min,然后移开光源,使MXene@Qu溶液自然冷却,冷却时间为3 min。重复升温—自然冷却这一过程,该过程共进行4次。在整个过程中,每隔20 s,利用红外热成像仪记录温度变化。

2.3.3 MXene水溶液与MXene复合物溶液的光热效应对比

取100 μ L质量浓度均为100 μ g/mL的MXene水溶液和MXene@Qu水溶液置于96孔板中,利用激发功率密度为1 W/cm²的808 nm近红外光照射溶液,用红外热成像仪记录5 min内溶液的温度变化。

2.3.4 光热转换效率的计算

取400 μ L质量浓度为100 μ g/mL的MXene@Qu水溶液并将其注射到比色皿中,用激光功率密度为1 W/cm²的808 nm近红外光照射溶液,利用热成像仪监测光照期间溶液的温度变化,并在溶液升温趋势趋于平缓时停止照射,待溶液自然冷却至室温。用红外热成像仪记录这一过程中溶液的温度变化。

2.4 细胞MTT实验

使用杜尔贝科改良的伊格尔培养基(DMEM)、10%胎牛血清(FBS)和1%抗生素-抗霉菌素(AA)配制改良培养基DMEM+;将肝癌细胞HepG2接种到96孔板中,加入DMEM+,然后将96孔板置于温度为37 °C、二氧化碳体积分数为5%的细胞培养箱中进行孵育。设置了6个实验组别来探究体外细胞杀伤效果,这6个组别分别是MXene组、MXene+激光组、槲皮素组、槲皮素+激光组、MXene@Qu组、MXene@Qu+激光组。具体实验步骤为:1)将HepG2细胞以每孔约104个细胞的密度接种到96孔板中,然后加入100 μ L DMEM+培养基,将96孔板置于温度为37 °C、二氧化碳体积分数为5%的细胞培养箱中孵育24 h;2)将96孔板从培养箱中取出,用移液枪缓慢移除原有的培养基,只保留底部的贴壁细胞,然后在不同组别中分别注入100 μ L不同质量浓度(20,40,60,80,100 μ g/mL,利用培养基DMEM+稀释)的溶液

(MXene 水溶液、MXene+Qu 水溶液及经修饰的槲皮素水溶液),在培养箱中孵育 24 h;3)在培养至 20 h 时,将光照组从培养箱中取出,用激发功率密度为 1 W/cm^2 的 808 nm 近红外光进行照射,每个孔照射 5 min,全部照射结束之后将 96 孔板放回培养箱中继续培养 4 h;4)培养结束后,向每个孔中滴加 $10 \mu\text{L}$ 质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液,继续在二氧化碳细胞培养箱中孵育 4 h,孵育结束后用移液枪缓慢吸去孔中的液体,然后向每个孔中注入 $100 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜,以溶解细胞中产生的甲瓚晶体;5)30 min 后,用酶标仪在 630 nm 光激发下测定每个孔的吸光度,进而计算出细胞存活率。

2.5 细胞的共聚焦荧光成像

肝癌 HepG2 细胞接种到培养皿后接受不同的处理,将样品分为空白组、仅激光照射组、MXene 组、MXene+激光组、槲皮素组、槲皮素+激光组、MXene@Qu 组、MXene@Qu+激光组;然后用混合了 Calcein-AM 和 PI 荧光染料的培养基对 HepG2 细胞进行染色;将染色后的细胞置于二氧化碳细胞培养箱中

培养 2 h,之后用汉克平衡盐溶液(HBSS)反复清洗,以去除游离的染色剂,并将细胞保存在 HBSS 中进行共聚焦荧光成像,以观察不同处理方式对细胞活性的影响。

3 实验结果及讨论

3.1 材料表征

本课题组构筑了基于 MXene 的光热/化疗协同治疗的纳米试剂,构建思路如图 1 所示。MXene 的制备主要分为两步。利用 LiF 和 HCl 反应生成的氢氟酸对 MAX 相中 Ti_3AlC_2 的 Al 原子层进行刻蚀^[16],得到手风琴状多层 Ti_3C_2 。多层 Ti_3C_2 在扫描电子显微镜(SEM)下的形貌如图 2(a)所示,可以观察到该多层 Ti_3C_2 的二维平面尺寸为 $3\sim 5 \mu\text{m}$,该尺寸并不适合用于纳米医学。因此,利用超声以及细胞破碎仪将多层 Ti_3C_2 破碎成单层且尺寸合适的 MXene 纳米片,其最终尺寸约为 200 nm ,如图 2(b)所示。该尺寸的 MXene 纳米片可以很好地满足纳米医学的要求,能够应用到生物体内进行光热治疗^[29]。

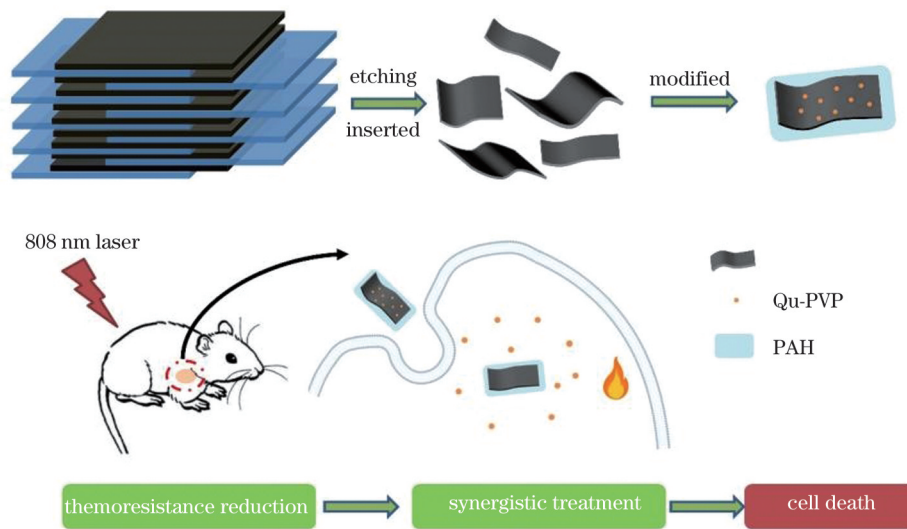


图 1 基于 MXene 光热/化疗协同治疗的纳米试剂构建示意图

Fig. 1 Schematic of constructing nano reagent for photothermal/chemotherapy synergistic treatment based on MXene

在光热/化疗协同治疗纳米试剂的构建过程中,考虑到 Ti_3C_2 表面带负电荷,所以可利用带正电荷的高分子聚丙烯胺盐酸盐^[30](PAH)对 Ti_3C_2 进行改性,使其表面带正电荷。正如之前所提到的,槲皮素的水溶性很差,而 PVP 可以有效提高槲皮素的溶解度和生物利用度,最终使 MXene 与槲皮素依靠静电吸附作用复合起来形成 MXene@Qu。MXene@Qu 在透射电子显微镜(TEM)下的形貌如图 2(c)所示。通过测试得到了 PAH 修饰的 MXene、PVP 修饰的槲皮素以及最终的 MXene@Qu 复合物的 Zeta 电位,如图 2(d)所示。由图 2(d)可以直观地观察到最终的复合物相较于 PAH 修饰的 MXene 的电位略有下降,这表明槲皮素已经成功复合到 MXene 表面。图 2(e)给出了 MXene、槲皮

素及 MXene@Qu 复合物的吸收光谱,可以观察到 MXene@Qu 复合物的吸收光谱中出现了槲皮素特有的 261 nm 吸收峰以及近红外附近 MXene 的吸收窗口。这进一步表明 MXene 与 Qu 复合成功。

图 2(f)中插图所示的紫外-可见-近红外吸收光谱显示了 MXene 水溶液的吸光度与其质量浓度之间的关系,图 2(f)给出了 MXene 水溶液在第一个生物窗口范围内吸光度的浓度依赖性。根据朗伯-比尔定律^[31] [$\alpha L = A/C$,其中 α 表示消光系数, A 表示 Ti_3C_2 纳米片在特定波长 808 nm 下的吸光度, C 表示 Ti_3C_2 纳米片的质量浓度, L 表示光路长度($L = 5 \text{ cm}$)],计算出 Ti_3C_2 纳米片水溶液的消光系数 α 为 $24.05 \text{ L}/(\text{g}\cdot\text{cm})$ 。这表明本实验制备的 Ti_3C_2 具有良好的近红外吸收性能。

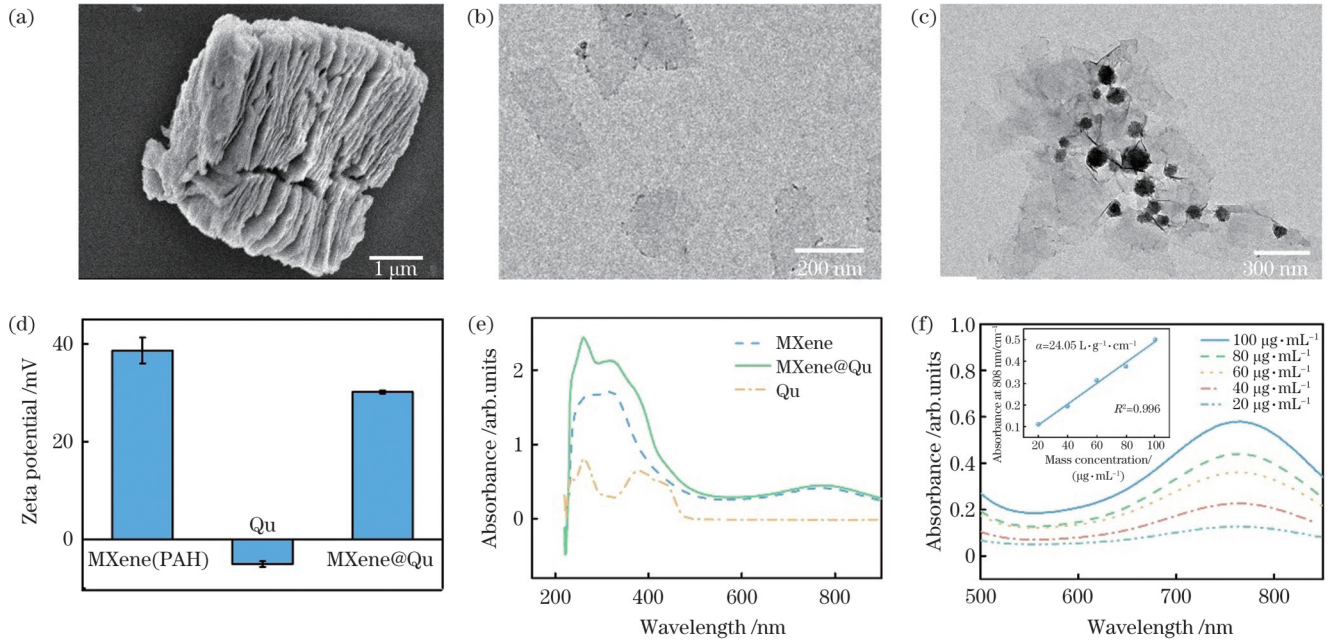


图2 材料表征。(a)多层 Ti_3C_2 的 SEM 图;(b) Ti_3C_2 纳米片的 TEM 图像;(c)MXene@Qu 纳米复合材料的 TEM 图像;(d)PAH 改性 MXene、槲皮素、MXene@Qu 的 Zeta 电位图;(e)MXene、槲皮素、MXene@Qu 的吸收光谱;(f)不同质量浓度的 MXene 水溶液的紫外-可见-近红外吸收光谱,插图显示了 MXene 水溶液在 808 nm 下的吸光度与其质量浓度之间的关系

Fig. 2 Materials characterization. (a) SEM image of multilayer Ti_3C_2 ; (b) TEM image of Ti_3C_2 nanosheets; (c) TEM image of MXene@Qu; (d) Zeta potentials of PAH improved MXene, Qu, and MXene@Qu; (e) absorption spectra of MXene, Qu, and MXene@Qu; (f) UV-vis-NIR spectra of MXene aqueous solution with various mass concentrations, where the inset shows the relationship between absorbance of MXene aqueous solution at 808 and its mass concentration

3.2 光热效果

3.2.1 体外光热效果

为了评估 Ti_3C_2 的光热转换效率,先用 808 nm 光激发 100 μ L 不同质量浓度的 MXene 水溶液。如图 3(a) 所示, MXene 水溶液的温度在很短的时间内快速上升,最终趋于稳定,并且与预期一样,温度升高具有浓度依赖性。然后,固定 MXene 水溶液的质量浓度为 100 μ g/mL,用不同激发功率密度的 808 nm 光进行照射。如图 3(b) 所示,随着激发功率密度增大,升温曲线发生了改变。这些结果表明可以通过调节 MXene 水溶液的质量浓度或激光强度来微调 Ti_3C_2 纳米片的光热效应。接着探究 Ti_3C_2 纳米片的光热稳定性。对 MXene@Qu 纳米复合材料进行 4 个加热冷却循环,结果显示,纳米复合材料的温度-时间曲线和峰形(加热冷却)没有发生明显变化,如图 3(c) 所示,这表明该 MXene@Qu 纳米复合材料具有良好的光热稳定性。相同质量浓度的 MXene 水溶液及 MXene@Qu 水溶液在相同激发功率密度下的温度-时间曲线如图 3(d) 所示,可见, MXene 的光热效应不受复合物槲皮素的影响。最后通过定量计算获得 MXene 的光热转换效率,计算结果如图 3(e)、(f) 所示。

根据以往的报道^[32],系统中的总能量平衡为

$$\sum_i m_i c_{p,i} \frac{dT}{dt} = Q_{MXene@Qu} + Q_{dis} - Q_{surr}, \quad (1)$$

式中: m_i 和 $c_{p,i}$ 是溶剂(水)的质量和比热容; T 表示溶

液的温度; $Q_{MXene@Qu}$ 表示 MXene@Qu 纳米复合材料的输入能量; Q_{surr} 表示通过空气传出系统的能量; Q_{dis} 表示光吸收导致系统散失的热量。在 808 nm 光照射下, $Q_{MXene@Qu}$ 可表示为

$$Q_{MXene@Qu} = P(1 - 10^{-A_{808}})\eta, \quad (2)$$

式中: η 表示 MXene@Qu 纳米复合材料的光热转换效率; P 表示近红外光的功率; A_{808} 表示纳米片在 808 nm 处的吸光度。 Q_{surr} 可表示为

$$Q_{surr} = hS(T - T_{surr}), \quad (3)$$

式中: h 为传热系数; S 为光照面积; T 为溶液实时温度; T_{surr} 为环境温度。当激光功率恒定时, $Q_{MXene@Qu} + Q_{dis}$ 是确定的,由式(3)可知输出的热量与溶液温度的变化正相关,因此当输出热量等于输入热量时,系统将达到最高温度。此时可得

$$Q_{MXene@Qu} + Q_{dis} = Q_{surr,max} = hS(T_{max} - T_{surr}), \quad (4)$$

式中: $Q_{surr,max}$ 表示当系统达到平衡温度时通过空气向外传递的热量; T_{max} 为平衡温度。结合式(1)~(4)可得到光热转换效率 η 的计算公式为

$$\eta = \frac{hS(T_{max} - T_{surr}) - Q_{dis}}{P(1 - 10^{-A_{808}})}, \quad (5)$$

式中: $T_{max} - T_{surr} = 23.6$ $^{\circ}C$; $P = 785$ mW; $Q_{dis} = 0.17$ mW; $A_{808} = 0.5001$ 。

MXene@Qu 水溶液的驱动温度 θ 的计算公式为

$$\theta = \frac{T - T_{surr}}{T_{max} - T_{surr}}. \quad (6)$$

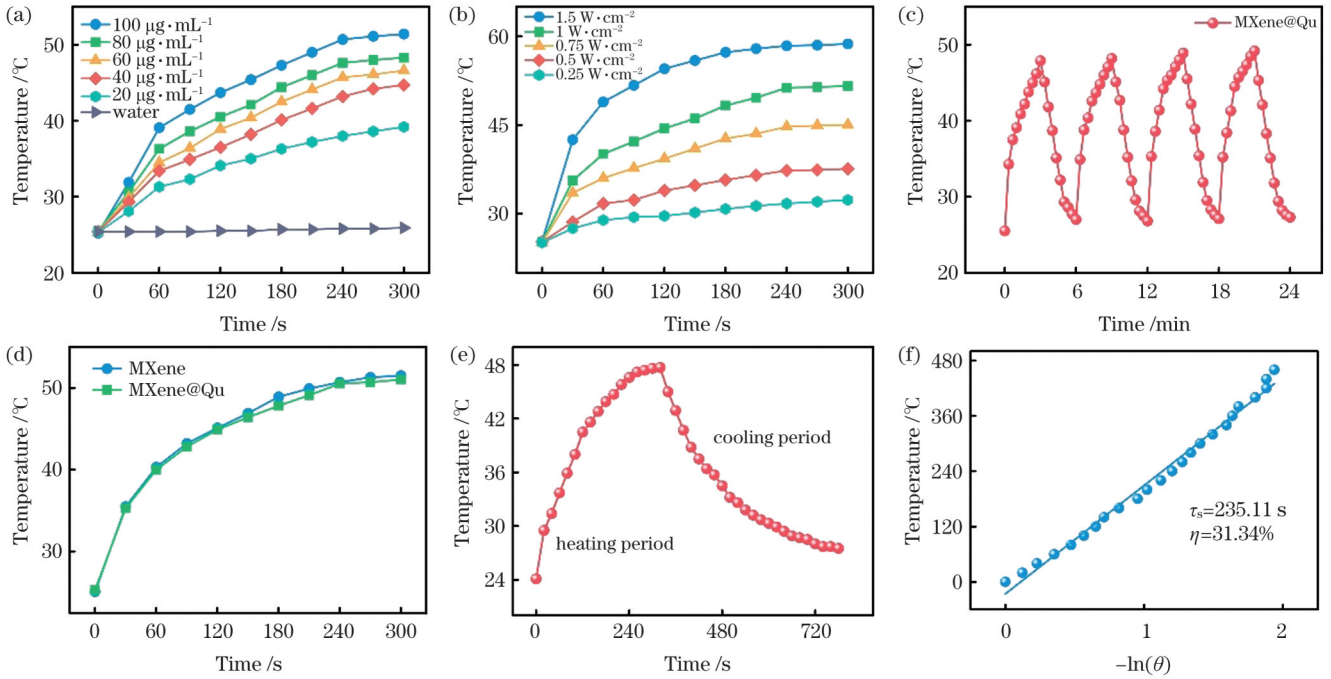


图 3 体外光热效果。(a)不同质量浓度MXene水溶液在808 nm近红外光照射(1 W/cm², 5 min)下的温度随时间的变化;(b)在不同激光功率密度的808 nm近红外光照射下,100 µg/mL MXene水溶液的温度随时间的变化;(c)100 µg/mL MXene@Qu水溶液在808 nm近红外光照射(1 W/cm², 5 min)下的光热稳定性;(d)质量浓度为100 µg/mL的MXene水溶液与MXene@Qu水溶液在1 W/cm²激发功率密度下的温度随时间的变化;(e)100 µg/mL MXene@Qu纳米复合材料水溶液从升温至自然冷却整个阶段的温度变化曲线(采用1 W/cm²的808 nm近红外光照射100 µg/mL MXene@Qu纳米复合材料水溶液240 s,之后停止照射,待溶液自然冷却);(f)MXene@Qu水溶液自然冷却阶段的时间数据与升温、冷却得到的驱动温度的负自然对数的线性拟合结果

Fig. 3 Photothermal effect *in vitro*. (a) Temperature versus time for different mass concentrations of MXene aqueous solution irradiated by 808 nm near-infrared (NIR) laser (1 W/cm², 5 min); (b) temperature versus time for 100 µg/mL MXene aqueous solution irradiated by 808 nm NIR laser with different laser power densities; (c) photothermal stability of 100 µg/mL MXene@Qu aqueous solution under 808 nm laser irradiation (1 W/cm², 5 min); (d) variation of temperature in time for 100 µg/mL MXene and MXene@Qu aqueous solutions at 1 W/cm² excitation power density; (e) temperature change curve of 100 µg/mL MXene@Qu nanocomposite aqueous solution from heating to natural cooling, where the solution was irradiated with 808 nm and 1 W/cm² laser for 240 s, and then the irradiation stopped to allow the solution to cool naturally; (f) linear fitting results between time data of natural cooling period of MXene@Qu aqueous solution and negative natural logarithm of driving temperature obtained by heating and cooling

传热时间常数 τ_s 的计算公式为

$$\tau_s = -\frac{t}{\ln(\theta)} \quad (7)$$

传热系数 h 、光接触面积 S 与传热时间常数 τ_s 之间的关系为

$$hS = \frac{m_i c_{p,i}}{\tau_s} \quad (8)$$

传热时间常数可以通过系统冷却阶段的线性时间数据和驱动温度 θ 的负对数得到。系统传热时间常数 $\tau_s = 235.11$ s, 水的质量为 0.4 g, 水的比热容为 4.2 J/(g·°C), hS 通过计算确定为 7.14 mW。综上所述, MXene@Qu 的光热转换效率为 31.34%, 相较于传统金纳米棒(21%)^[33]、Cu_{2-x}Se 纳米晶体(22%)^[34] 显著提高。

3.2.2 细胞内光热治疗效果

以肝癌细胞 HepG2 为模型细胞系, 通过标准的

MTT 检测法评估了 MXene@Qu 的生物相容性及体外光热治疗效果。从图 4 中可以观察到, 即使是经 100 µg/mL MXene 处理后, 肝癌细胞 HepG2 的存活率仍为 90.89%。这一结果表明了 Ti₃C₂ 纳米片出色的生物相容性。与 MXene 处理的细胞相比, MXene@Qu 处理的细胞的活性由于 Ti₃C₂ 纳米片释放出具有抗癌效果的槲皮素而略有降低。观察激发功率为 1 W/cm² 的 808 nm 近红外光照射后的效果可以发现, MXene 是以剂量依赖性的方式产生热量并杀死癌细胞的, 在质量浓度为 100 µg/mL 的 MXene 处理下, 细胞存活率仅为 57.66%。在经 MXene@Qu 纳米试剂处理的细胞中可以观察到显著增强的癌细胞杀伤效果, 超过 78.91% 的细胞被杀死(细胞存活率仅为 21.09%), 说明该纳米试剂在激光照射下实现了光热治疗与化疗的协同作用, 达到了良好的治疗效果。

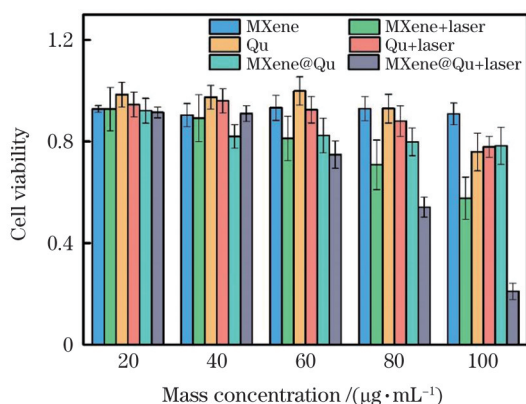


图4 MXene、槲皮素、MXene@Qu 处理的 HepG2 细胞在有无 808 nm 光照射 ($1 \text{ W}/\text{cm}^2$, 5 min) 下的细胞活性
Fig. 4 Cell viability of HepG2 cells treated with MXene, free Qu, and MXene@Qu under 808 nm laser irradiation ($1 \text{ W}/\text{cm}^2$, 5 min) or not

共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 成像可以进一步

确认光热治疗对细胞的杀伤效果。针对经近红外激光照射后的 HepG2 细胞,用钙黄绿素-AM(激发波长为 494 nm,发射波长为 517 nm,绿色荧光,用于活细胞染色)和碘化丙啶(激发波长为 535 nm,发射波长为 617 nm,红色荧光,用于死细胞染色)进行染色,染色后用共聚焦激光扫描显微镜进行观察,结果如图 5 所示。相较于 MXene+激光组, MXene@Qu+激光组表现出更多红色。这说明 MXene@Qu 纳米试剂与激光照射的协同治疗对肿瘤细胞形成了有效的消融作用,因此出现大量坏死细胞。与其他组别相比,对照 (control) 组和 MXene 组几乎没有出现细胞损伤;槲皮素组呈现出的绿光略微减弱(这是因为槲皮素本身作为一种抗癌药物就具有一定的抗癌效果,但不足以造成细胞大批量死亡)。以上共聚焦激光扫描显微镜成像结果进一步证明了 MXene@Qu 纳米试剂在 808 nm 近红外光照射下具有优异的光热/化疗协同治疗能力以及较高的生物相容性。

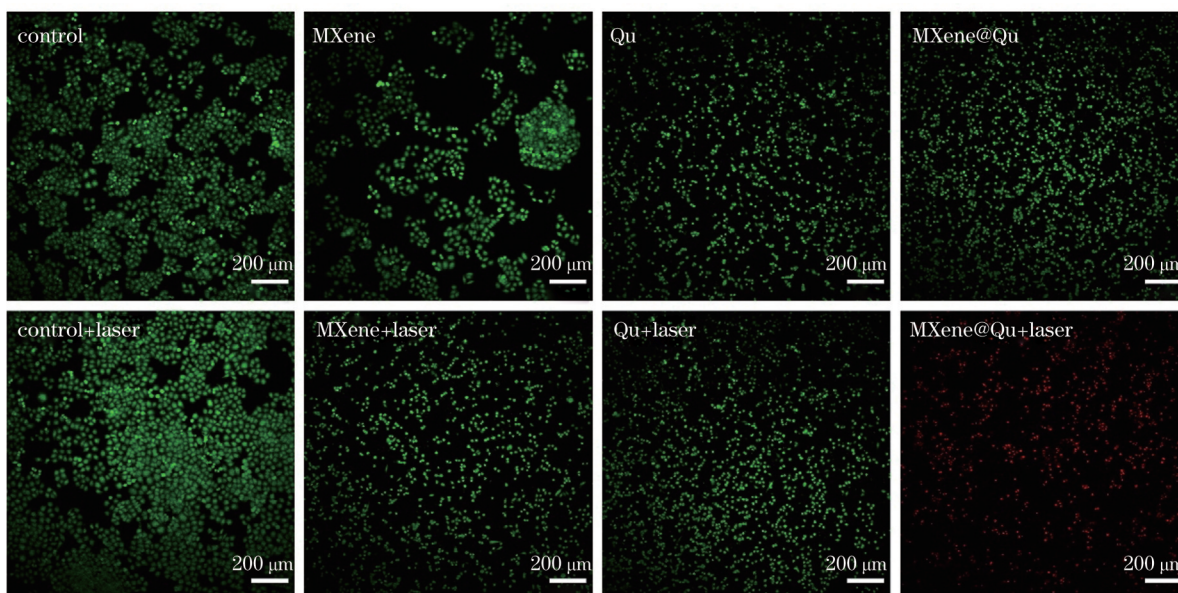


图5 HepG2 肿瘤细胞经不同方法处理后的共聚焦激光扫描显微镜图像
Fig. 5 Confocal laser scanning microscopy images of HepG2 cells treated by different methods

4 结 论

本课题组构筑了基于 MXene 的光热/化疗协同治疗的纳米试剂,该纳米复合材料的平面尺寸在 200~300 nm 范围内,符合纳米医学的要求。通过 TEM 图像、Zeta 电位以及紫外-可见光-红外吸收光谱可以确定槲皮素已经成功复合到纳米片上。之后测试了该纳米试剂在第一生物窗口的吸光度与其水溶液质量浓度之间的关系,通过计算可得出该纳米试剂的消光系数为 $24.05 \text{ L}/(\text{g} \cdot \text{cm})$ 。之后对该纳米试剂的光热效果进行评估,评估结果显示该纳米试剂的光热效果具有浓度依赖性和功率依赖性,因此可以通过微调浓度和功率达到想要的温度环境。对该纳米试剂进行反复激

光照射并冷却后发现其峰值和波形几乎没有改变,说明该材料具有良好的光热稳定性。通过计算一个升温冷却循环得到该纳米试剂的光热转换效率为 31.34%,相较于其他光热剂具有更出色的光热转换效果。在体外细胞实验中,该纳米试剂的肿瘤细胞杀伤率达到了 78.91%,具有良好的光热/化疗协同治疗效果。在下一步实验中,本课题组将继续探究该纳米试剂的协同治疗效果,并且构建荷瘤小鼠模型,探究其在体内的光热治疗效果。

参 考 文 献

[1] Wei W F, Zhang X Y, Zhang S, et al. Biomedical and bioactive engineered nanomaterials for targeted tumor photothermal therapy: a review[J]. Materials Science and Engineering: C, 2019, 104:

- 109891.
- [2] Wu J R, Bremner D H, Niu S W, et al. Chemodrug-gated biodegradable hollow mesoporous organosilica nanotheranostics for multimodal imaging-guided low-temperature photothermal therapy/chemotherapy of cancer[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(49): 42115-42126.
- [3] Liu H J, Wang M M, Hu X X, et al. Enhanced photothermal therapy through the *in situ* activation of a temperature and redox dual-sensitive nanoreservoir of triptolide[J]. Small, 2020, 16(38): e2003398.
- [4] Chen B Q, Kankala R K, Zhang Y, et al. Gambogic acid augments black phosphorus quantum dots (BPQDs)-based synergistic chemo-photothermal therapy through downregulating heat shock protein expression[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 390: 124312.
- [5] Chen J Q, Ning C Y, Zhou Z N, et al. Nanomaterials as photothermal therapeutic agents[J]. Progress in Materials Science, 2019, 99: 1-26.
- [6] Gao G, Sun X B, Liang G L. Nanoagent-promoted mild-temperature photothermal therapy for cancer treatment[J]. Advanced Functional Materials, 2021, 31(25): 2100738.
- [7] Fu Z, Williams G R, Niu S W, et al. Functionalized boron nanosheets as an intelligent nanoplatform for synergistic low-temperature photothermal therapy and chemotherapy[J]. Nanoscale, 2020, 12(27): 14739-14750.
- [8] Yang L J, Hou X X, Zhang Y M, et al. NIR-activated self-sensitized polymeric micelles for enhanced cancer chemo-photothermal therapy[J]. Journal of Controlled Release, 2021, 339: 114-129.
- [9] 黎黎, 张悦, 李萌茜, 等. 激光技术在眼科的应用现状与进展[J]. 中国激光, 2022, 49(5): 0507103.
Li L, Zhang Y, Li M X, et al. Current application and progress of laser technology in ophthalmology[J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(5): 0507103.
- [10] Sun Q Q, Tang K, Song L Q, et al. Covalent organic framework based nanoagent for enhanced mild-temperature photothermal therapy[J]. Biomaterials Science, 2021, 9(23): 7977-7983.
- [11] Sun T T, Chen X X, Wang X, et al. Enhanced efficacy of photothermal therapy by combining a semiconducting polymer with an inhibitor of a heat shock protein[J]. Materials Chemistry Frontiers, 2019, 3(1): 127-136.
- [12] Huang X Y, Lu Y, Guo M X, et al. Recent strategies for nano-based PTT combined with immunotherapy: from a biomaterial point of view[J]. Theranostics, 2021, 11(15): 7546-7569.
- [13] Jung H S, Verwilt P, Sharma A, et al. Organic molecule-based photothermal agents: an expanding photothermal therapy universe [J]. Chemical Society Reviews, 2018, 47(7): 2280-2297.
- [14] 梁国海, 邢达. 用于肿瘤光热治疗的有机纳米材料研究进展[J]. 中国激光, 2018, 45(2): 0207020.
Liang G H, Xing D. Progress in organic nanomaterials for laser-induced photothermal therapy of tumor[J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207020.
- [15] 李治, 千维娜, 魏思敏, 等. 光热转换纳米材料在肿瘤光热治疗中的应用[J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(17): 170005.
Li Z, Qian W N, Wei S M, et al. Application of photothermal conversion nanomaterials in tumor photothermal therapy[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(17): 170005.
- [16] Ruiz-Pérez L, Rizzello L, Wang J P, et al. Polypyrrole and polyaniline nanocomposites with high photothermal conversion efficiency[J]. Soft Matter, 2020, 16(19): 4569-4573.
- [17] Kurtoglu M, Naguib M, Gogotsi Y, et al. First principles study of two-dimensional early transition metal carbides[J]. MRS Communications, 2012, 2(4): 133-137.
- [18] Huang H Y, Jiang R M, Feng Y L, et al. Recent development and prospects of surface modification and biomedical applications of MXenes[J]. Nanoscale, 2020, 12(3): 1325-1338.
- [19] Soleymaniha M, Shahbazi M A, Rafieerad A R, et al. Promoting role of MXene nanosheets in biomedical sciences: therapeutic and biosensing innovations[J]. Advanced Healthcare Materials, 2019, 8(1): e1801137.
- [20] Lu B B, Zhu Z Y, Ma B Y, et al. 2D MXene nanomaterials for versatile biomedical applications: current trends and future prospects[J]. Small, 2021, 17(46): e2100946.
- [21] Yu Z Z, Jiang L, Liu R Y, et al. Versatile self-assembled MXene-Au nanocomposites for SERS detection of bacteria, antibacterial and photothermal sterilization[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 426: 131914.
- [22] Rashid B, Anwar A, Shahabuddin S, et al. A comparative study of cytotoxicity of PPG and PEG surface-modified 2-D Ti3C2 MXene flakes on human cancer cells and their photothermal response[J]. Materials, 2021, 14(16): 4370.
- [23] Han X X, Huang J, Lin H, et al. 2D ultrathin MXene-based drug-delivery nanoplatform for synergistic photothermal ablation and chemotherapy of cancer[J]. Advanced Healthcare Materials, 2018, 7(9): e1701394.
- [24] Tabuchi Y, Kondo T. Targeting heat shock transcription factor 1 for novel hyperthermia therapy (review)[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2013, 32(1): 3-8.
- [25] 付博, 赵小丽, 张晗, 等. 激光技术在血栓消融中的应用与进展[J]. 中国激光, 2022, 49(19): 1907001.
Fu B, Zhao X L, Zhang H, et al. Application and progress of laser technology in thrombus ablation[J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(19): 1907001.
- [26] Gao G, Jiang Y W, Sun W, et al. Molecular targeting-mediated mild-temperature photothermal therapy with a smart albumin-based nanodrug[J]. Small, 2019: 1900501.
- [27] Zhong Y P, Zou Y B, Liu L Y, et al. pH-responsive Ag₂S nanodots loaded with heat shock protein 70 inhibitor for photoacoustic imaging-guided photothermal cancer therapy[J]. Acta Biomaterialia, 2020, 115: 358-370.
- [28] Tian H L, Zhang J, Zhang H Y, et al. Low side-effect and heat-shock protein-inhibited chemo-phototherapy nanoplatform via co-assembling strategy of biotin-tailored IR780 and quercetin[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 382: 123043.
- [29] Cho K, Wang X, Nie S M, et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2008, 14(5): 1310-1316.
- [30] Tang W T, Dong Z L, Zhang R, et al. Multifunctional two-dimensional core-shell MXene@gold nanocomposites for enhanced photo-radio combined therapy in the second biological window[J]. ACS Nano, 2019, 13(1): 284-294.
- [31] Lin H, Wang X G, Yu L D, et al. Two-dimensional ultrathin MXene ceramic nanosheets for photothermal conversion[J]. Nano Letters, 2017, 17(1): 384-391.
- [32] Lin H, Gao S S, Dai C, et al. A two-dimensional biodegradable niobium carbide (MXene) for photothermal tumor eradication in NIR- I and NIR- II biowindows[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(45): 16235-16247.
- [33] Zeng J, Goldfeld D, Xia Y N. A plasmon-assisted optofluidic (PAOF) system for measuring the photothermal conversion efficiencies of gold nanostructures and controlling an electrical switch[J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2013, 52(15): 4169-4173.
- [34] Hessel C M, Pattani V P, Rasch M, et al. Copper selenide nanocrystals for photothermal therapy[J]. Nano Letters, 2011, 11(6): 2560-2566.

Construction of Photothermal/Chemotherapy Synergistic Therapy Nano Reagent Based on Two-Dimensional Ti_3C_2 (MXene) and Its Photothermal Effect

Fu Gege, Lu Yang, Pan Jialin, Li Xu, Wang Chenguang, Liu Xiaomin*, Lu Geyu

State Key Laboratory on Integrated Optoelectronics, College of Electronic Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130012, Jilin, China

Abstract

Objective Traditional cancer treatments include surgery, radiation therapy, and chemotherapy; however, they have evident side effects. On the contrary, photothermal therapy has attracted considerable attention because of its non-invasive properties, precision, and lower side effects. Photothermal therapy is a treatment method in which a material with high photothermal conversion efficiency is injected into the biological body, and the material converts laser energy into heat energy to kill cancer cells under the irradiation of an external laser source. However, cells in hot environments initiate self-protection measures to resist the damage caused by high temperatures. To optimize the effect of photothermal therapy, a two-dimensional Ti_3C_2 (MXene)-based nano reagent for synergistic photothermal chemotherapy was constructed, quercetin was selected as an anticancer drug, and the inhibitory effect of the nano reagent on tumor cells was explored at the cellular level.

Methods In this study, LiF/HCl was used to selectively etch the Al layer of Ti_3AlC_2 to obtain accordion-like multilayer Ti_3C_2 . The obtained wet precipitate was then dissolved in 40 mL of ethanol, sonicated for 80 min to cause initial stratification of the aggregates, washed repeatedly, and thereafter dissolved in deionized water. Finally, the supernatant was obtained as a nanosheet colloidal dispersion by centrifugation and purification after sonication in an ultrasonic cell crusher. Subsequently, the nanosheet surface was modified with the positively charged polymer polypropylene amine hydrochloride to make it positively charged, and PVP-modified quercetin was compounded onto the nanosheet by electrostatic adsorption to form a nanoreagent for synergistic photothermal/chemotherapy treatment. Next, the surface morphology was observed using transmission electron microscopy (TEM), and the composite was analyzed using Zeta potential analysis and absorption spectroscopy. The photothermal effects of the nanosheets and their complexes were subsequently evaluated, and the antitumor effects of this synergistic therapeutic nanoagent were evaluated in cells.

Results and Discussions The prepared nanosheets are suitable in size, between about 200–300 nm, and applicable in biomedicine. It can also be observed that quercetin was successfully compounded onto the nanosheets [Fig. 2(c)]. By testing the Zeta potential of the PAH-modified MXene, PVP-modified quercetin, and the final compound, it can be visually confirmed that the final compound has a slightly decreased potential compared to the modified MXene. This indicates that quercetin was successfully complexed to the nanosheet surface [Fig. 2(d)]. Next, the absorption spectra of MXene, quercetin, and MXene@Qu were tested separately, and it was observed that the absorption peak at 261 nm is characteristic to quercetin, and the absorption window of MXene near the NIR appeared in the absorption spectrum of MXene@Qu. This further indicates that the MXene and quercetin were successfully compounded [Fig. 2(e)]. The UV-Vis-NIR absorption spectra revealed the relationship between the absorbance intensity of aqueous Ti_3C_2 nanosheets and the concentration of the material, which showed the concentration dependence of the absorbance of the composites in the first biological window [Fig. 2(f)]. The extinction coefficient α of the aqueous Ti_3C_2 nanosheets was calculated to be 24.05 L/(g·cm) according to the Lambert-Beer law, indicating that the prepared Ti_3C_2 has good near-infrared absorption properties. Subsequently, the concentration and excitation power were changed to observe the concentration- and power-dependent photothermal effects of the nanosheets, indicating that the photothermal effects can be fine-tuned by adjusting the nanosheet concentration or laser intensity. MXene@Qu exhibited good photothermal stability in subsequent heating and cooling cycles. The photothermal conversion efficiency of this nanosheet, obtained by quantitative calculation through one heating-cooling cycle to be 31.34% (Fig. 3). Then, via MTT cytotoxicity assay, it was found that more than 78.91% of the cells of this nanoreagent were killed by laser irradiation, which has a good anti-tumor effect (Fig. 4). In addition, the highest number of dead cells in the MXene@Qu+laser group was qualitatively observed in the live – dead cell staining (Fig. 5). The nanoreagent has excellent anti-tumor effects and achieves good therapeutic results in the *in vivo* cellular assays, leading to 78.91% cell death. In the future experiments, we will continue to explore the synergistic therapeutic effect of this nanoagent and construct HepG2 tumor-bearing nude mice to explore the effect of photothermal treatment *in vivo* to achieve the expected effect and effectively improve the efficiency of photothermal treatment.

Conclusions In this study, we constructed a two-dimensional Ti_3C_2 (MXene)-based nanoreagent for synergistic photothermal chemotherapy treatment and described the therapeutic effects of the photothermal platform in terms of material properties, *in vitro* photothermal effects, and intracellular photothermal therapeutic effects. Compared with other photothermal agents, this nanoagent has a high conversion effect (31.34%), good photothermal stability, suitable size, and good hydrophilicity, all of which are in line with the requirements of nanobiotechnology.

Key words medical optics; photothermal therapy; MXene; chemotherapy; near-infrared light; nanomaterial