

氧化硅基杂化胶束负载 Flav7 光热剂的合成与性能研究

池哲人¹, 张辽², 郭志前², 李永生^{1,3}, 牛德超¹

(1. 华东理工大学 材料科学与工程学院, 上海 200237; 2. 华东理工大学 化学与分子工程学院, 上海 200237; 3. 石河子大学 化学化工学院, 石河子 832003)

摘要: 近年来, 由于具有较好的近红外区吸收、结构可调等特点, 有机小分子光热剂在生物医药领域展示出广阔的应用前景。然而, 大部分有机小分子光热剂仍面临水溶性较差、生物稳定性不佳、光热转换效率较低等挑战。本研究发展了一种简便的合成方法, 制备了负载 Flav7 的氧化硅基杂化胶束(FPOMs)用于高效的光热治疗。首先利用嵌段共聚物 PS₁₃₂-*b*-PAA₁₆ 自组装行为负载疏水近红外有机小分子 Flav7 得到胶束体系, 进一步引入 3-巯基丙基三甲氧基硅烷(MPTMS)和聚乙二醇(PEG)对上述胶束体系进行结构固定和表面改性得到 FPOMs。研究表明, 在 808 nm 波长激光的激发下, FPOMs 展现出优异的光热稳定性和较高的光热转换效率(46.7%)。细胞实验证实 FPOMs 具有良好的生物相容性和光热毒性, 有望作为一类新型的纳米光热剂用于肿瘤高效安全光热治疗。

关键词: Flav7; 氧化硅基材料; 胶束; 光热性能

中图分类号: TQ138 文献标志码: A

Flav7-loaded Silica-based Hybrid Micelles: Synthesis and Photothermal Performance

CHI Zheren¹, ZHANG Liao², GUO Zhiqian², LI Yongsheng^{1,3}, NIU Dechao¹

(1. School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: Recently, organic small molecule photothermal agents have great application potentials in the field of biomedicine due to their high extinction coefficient in the near-infrared region and good structural tunability. Unfortunately, most current organic small molecular photothermal agents prove to be still poor water solubility, unsatisfactory biological stability, and low photothermal conversion efficiency. To address these, a simple method was developed to prepare Flav7-loaded silica-based hybrid micelles (FPOMs) for efficient photothermal therapy. Firstly, the Flav7-loaded micelles were prepared by self-assembly of block copolymer PS₁₃₂-*b*-PAA₁₆. Then, 3-mercaptopropyl trimethoxysilane (MPTMS) and polyethylene glycol (PEG) were introduced to fix the structure and endowed the surface modification of the system, respectively, resulting in the final formation of FPOMs. Results show that FPOMs exhibit excellent photothermal stability and high photothermal conversion efficiency (46.7%) under the excitation of 808 nm laser. Cell experiments indicate that FPOMs have good biocompatibility and photothermal toxicity. It is highly expected to be used as a new type of nano-photothermal agent for efficient and safe photothermal therapy.

Key words: Flav7; silica-based material; micelle; photothermal property

收稿日期: 2022-04-21; 收到修改稿日期: 2022-05-07; 网络出版日期: 2022-06-16

基金项目: 国家自然科学基金(52072124); 上海市自然科学基金(20ZR1414900)

National Natural Science Foundation of China (52072124); Natural Science Foundation of Shanghai (20ZR1414900)

作者简介: 池哲人(1997-), 男, 硕士研究生. E-mail: chizheren@163.com

CHI Zheren (1997-), male, Master candidate. E-mail: chizheren@163.com

通信作者: 郭志前, 教授. E-mail: guozq@ecust.edu.cn; 牛德超, 教授. E-mail: dcnui@ecust.edu.cn

GUO Zhiqian, professor. E-mail: guozq@ecust.edu.cn; NIU Dechao, professor. E-mail: dcnui@ecust.edu.cn

光热疗法(Photothermal Therapy, PTT)是利用可见光或近红外光在组织内产生局部热, 杀死癌细胞的一种有效治疗方法^[1-3]。近年来, 各种具有近红外吸收能力的光热剂(Photothermal Agents, PTAs)被开发出来, 包括无机 PTAs 和有机 PTAs, 以促进高效产热^[3-4]。一般来说, 无机 PTAs 比有机 PTAs 具有更高的光热转换效率和更好的光热稳定性; 有机 PTAs 则在生物降解性和生物安全性方面更胜一筹^[5-6]。众所周知, 有机 PTAs 一般分为小分子试剂和半导体聚合物纳米粒子(Semi-conductor Polymer Nanoparticles, SPNPs)^[7-8]。其中, 有机小分子 PTAs, 如菁染料和卟啉, 已经被广泛应用于癌症的成像和治疗^[5, 9]。然而, 这些小分子多存在水溶性差、易光漂白和光热转换效率较低等问题。

基于上述问题, 研究人员提出利用表面改性技术或纳米载体递送有机小分子 PTAs 的策略来克服游离小分子直接递送的缺点, 从而有效改善小分子的溶解性和药代动力学, 增强其在肿瘤组织内的穿透和滞留、抗光漂白和提高光热转换效率, 表现出更好的光热治疗效果^[5, 10-13]。Cheng 等^[14]将探针分子 ET-1080 和两亲性多肽共价偶联, 自组装形成一种纳米光热剂, 基于肿瘤部位的有效积累和较高的光热转换效率(40.07%), 其在波长 1064 nm 光照下对携带乳腺肿瘤的小鼠具有优异的光热治疗效果。Cosco 等^[15]开发了一种新型七甲川菁染料 Flav7, 其在近红外-II 区(NIR-II)具有良好的吸收和发射性能。由于在水中强烈的聚集淬灭效应, Flav7 被装入脂质体胶束中用于 NIR-II 区活体成像。Li 等^[16]则将 Flav7 与两亲性多肽共价键偶联, 自组装形成一体化纳米光热剂, 具有良好的光物理性能、良好的光热转换效率(42.3%)和优异的光热稳定性。然而, 这些胶束基纳米光热剂的制备多涉及繁冗苛刻的偶联修饰工艺, 限制了其应用。因此, 发展一种简便的方法制备光热性能优异的新型纳米光热剂仍是该领域面临的主要挑战之一。

本研究利用本实验室前期发展的氧化硅基杂化胶束体系^[17], 设计构建了一种负载 Flav7 的新型氧化硅基杂化胶束(Flav7-loaded silica-based hybrid micelles, FPOMs)用于高效光热治疗, 并表现出优异的性能。

1 实验方法

1.1 Flav7 的制备

按照文献报道的方法合成化合物 1: (7-*N,N*-二甲氨基-4-甲基-黄酮高氯酸盐)^[15]和化合物 2: (*N*-(3-(苯胺基亚甲基)-2-氯-1-环己烯-1-基)亚甲基]苯胺盐酸盐)^[18]。将化合物 1 (40 mg, 0.11 mmol)、化合物 2 (18 mg, 0.05 mmol)和无水乙酸钠(12 mg, 0.15 mmol)溶于乙醇(3 mL)中, 90 °C 加热 6 h。将溶液冷却至室温, 硅胶干燥(如图 1 所示)。以二氯甲烷/甲醇体积比 98:2 混合溶液作洗脱剂, 用硅胶层析法纯化, 得到 Flav7 5 mg 粗品, 产率为 13%。

1.2 负载 Flav7 的氧化硅基杂化胶束的制备

将 2 mg PS₁₃₂-*b*-PAA₁₆ 和 0.2 mg Flav7 分散于 2 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中, 快速搅拌(600 r/min) 10 min 使其完全溶解。取 8 mL 超纯水加入到剧烈搅拌的溶液中, 继续搅拌 30 min。随后将混合溶液转移到截留分子量为 14000 的透析袋中透析 24 h。透析后得到负载 Flav7 的聚合物胶束(Flav7-Micelles, FMs)。

将 40 μ L 氨水(NH₃-H₂O)和 10 μ L 3-巯基丙基三甲氧基硅(MPTMS)逐滴加入到 FMs 溶液中, 置于室温下搅拌(600 r/min)24 h。将上述溶液在水中透析 24 h, 得到负载 Flav7 的氧化硅基杂化胶束(Flav7-Organosilica-Micelles, FOMs)。

将 20 mg 甲氧基聚乙二醇-马来酰亚胺(mPEG-MAL)加入到上述溶液中搅拌 6 h, 然后在水中透析 12 h。最终得到 PEG 修饰且负载 Flav7 的氧化硅基杂化胶束(Flav7-PEGylated-Organosilica-Micelles, FPOMs)。

1.3 稳定性测试

分别各取 1 mL FMs 溶液和 1 mL FPOMs 溶液加入到 4 mL 去离子水, 4 mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS), 4 mL 含 10%胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)的 RPMI-1640 培养基和 4 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基中(溶液置于恒温振荡器中, 37 °C)。在 1 w 时间里利用动态

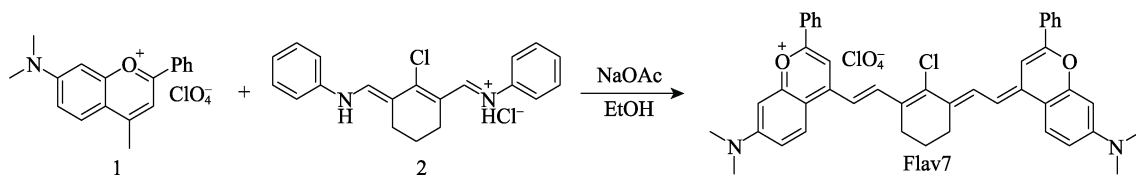


图 1 Flav7 的合成示意图

Fig. 1 Schematic diagram for the synthesis of Flav7

光散射仪(DLS)监测材料的水合动力学粒径变化(间隔 24 h)。

1.4 光热性能测试

1) FPOMs 的光热稳定性。用波长 808 nm 的近红外激光照射 FPOMs 和 Flav7 溶液 5 min, 然后在没有近红外激光照射的条件下自然冷却 10 min, 反复操作 10 次, 以测试 FPOMs 和 Flav7 的光热稳定性。

2) 光热转换效率计算。用波长为 808 nm 的 1.0 W/cm² 激光照射 FPOMs 溶液, 待其冷却至室温后, 计算光热转换效率。在这个过程中, 每隔 30 s 记录一次溶液的温度。根据 Roper 等^[19]的报告, 可以参照公式(1)计算光热转换效率(η):

$$\eta = \frac{hA(T_{\max} - T_{\text{surr}}) - Q_{\text{Dis}}}{I(1 - 10^{-A_{\lambda}})} \quad (1)$$

公式(1)中, h 表示换热系数, A 表示容器的表面积, T_{\max} 表示最高稳态温度(对于 FPOMs 为 57.1 °C), T_{surr} 表示环境温度(20.0 °C), Q_{Dis} 表示被溶剂和样品容器吸收的光的散热。 I 是入射激光功率密度(1.0 W/cm²), A_{λ} 是样品在入射光波长 808 nm 处的吸光度。 hA 参照公式(2)计算:

$$hA = \frac{m_D c_D}{\tau_s} \quad (2)$$

其中, m_D 和 c_D 分别表示 FPOMs 的溶液质量和比热容。 τ_s 参考公式(3)计算:

$$t = -\tau_s \ln \theta \quad (3)$$

其中, t 表示冷却期的时间。 θ 参照公式(4)计算:

$$\theta = \frac{T - T_{\text{surr}}}{T_{\max} - T_{\text{surr}}} \quad (4)$$

其中, T 表示冷却期内的实时温度。

1.5 细胞毒性

用 CCK-8 法测定 FPOMs 对 SMMC-7721 人肝癌细胞、NIH-3T3 小鼠胚胎成纤维细胞和 MEF 小鼠胚胎成纤维细胞的细胞毒性。将 SMMC-7721 细胞、NIH-3T3 细胞和 MEF 细胞以 5000 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板中培养 24 h 后, 分别加入含不同浓度的 FPOMs (25、50、100、150、300 μg/mL) 的新鲜培养基培养 24 h, 其中 SMMC-7721 细胞分为 808 nm 波长激光激发和不激发两组。最后使用 CCK-8 法测定细胞的活性。细胞相对存活率按公式(5)计算:

$$\text{Cell viability} = \frac{A_T}{A_C} \times 100\% \quad (5)$$

其中, A_T 和 A_C 分别代表实验组和对照组在波长 450 nm 处的光密度(OD)。定义对照组细胞的存活率为 100%。

1.6 细胞凋亡分析

将培养好的 SMMC-7721 细胞以 10⁵ 细胞/孔的密度接种于六孔板中孵育 24 h。待其完全贴壁后, 其中每孔分别加入含 0、150 和 300 μg/mL FPOMs 的新鲜培养基孵育 6 h 后, 使用 808 nm 波长激光(1.0 W/cm²)照射 5 min。在新鲜的 PBS 洗涤细胞后, 使用钙黄绿素 AM (Calcein AM) 和碘化丙啶(PI) 活死细胞染色试剂盒对细胞进行染色。最后用激光共聚焦显微镜观察细胞形态。

将培养好的 SMMC-7721 细胞以 10⁵ 细胞/孔的密度接种于六孔板中孵育 24 h。待其完全贴壁后, 进行以下处理: 对照组, 仅添加新鲜培养基与细胞共孵育 12 h; NIR 组, 仅加入培养基的细胞用 808 nm 波长激光(1.0 W/cm²)照射 5 min; FPOMs 组, 细胞与含 300 μg/mL FPOMs 的培养基共孵育 12 h; FPOMs+NIR 组, 细胞与含 300 μg/mL FPOMs 的培养基共孵育 12 h 后, 再用 808 nm 波长激光(1.0 W/cm²)照射 5 min。继续孵育 6 h 后, PBS 洗涤细胞, 并用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化细胞。离心收集细胞后, 使用 Annexin V FITC/PI 凋亡检测试剂盒对各组细胞进行染色, 使用 BD Accuri C6 流式细胞仪对细胞进行分析。每个样品至少获得 10⁴ 个细胞。

1.7 统计学分析方法

定量结果表示为平均值±标准偏差(SD)。显著性差异由软件 GraphPad Prism 根据非配对 t 检验进行分析: *为 $p < 0.05$, **为 $p < 0.01$, ***为 $p < 0.001$ 。

2 结果与讨论

2.1 FPOMs 制备及形貌结构

图 2 为 FPOMs 的合成示意图, 以 DMF 为油相,

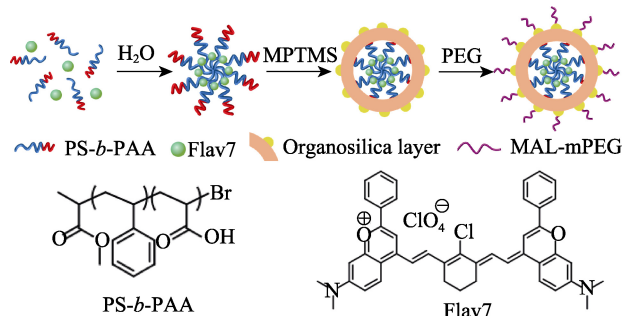


图 2 FPOMs 的合成示意图

Fig. 2 Schematic illustration for the fabrication of FPOMs
MPTMS: 3-Mercaptopropyl trimethoxysilicon; PEG: Polyethylene glycol;
MAL-mPEG: Maleimide-methoxy (polyethylene glycol); PS-*b*-PAA:
Polystyrene-block-polyacrylic acid; FPOMs: Flav7-PEGylated-
organosilica-micelles

The color figure can be obtained from online edition

嵌段共聚物 PS₁₃₂-*b*-PAA₁₆ 为两亲性表面活性剂, 在水包油型微乳液体系中自组装 FMs 胶束, 然后以 MPTMS 为硅烷前驱体在水中合成 FOMs 杂化胶束, 最后利用杂化胶束表面的巯基与 mPEG-MAL 的马来酰亚胺基团的加成反应制得 FPOMs(图 2)。

从 FPOMs 的 TEM 结果分析可以看出(图 3), FPOMs 胶束的形貌为球形, 直径约为 20 nm。此外, 由于 TEM 制样工艺的限制, 干燥后的 FPOMs 呈现一定的团聚现象, 且稍有收缩^[20]。面扫描元素分析结果表明(图 4), Si、O 和 S 三种元素主要分布在 FPOMs 纳米胶束的外壳上, 表明 MPTMS 的水解缩聚主要发生在胶束的亲水外壳区域, 这之前报道的结果一致^[21]。

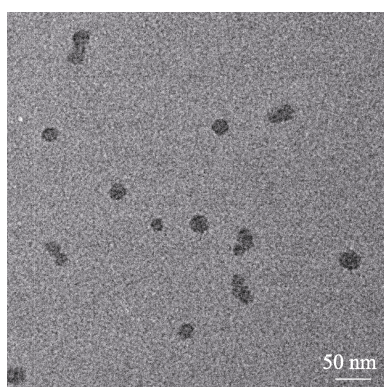


图 3 FPOMs 的透射电镜照片

Fig. 3 TEM image of Flav7-PEGylated-organosilica-micelles (FPOMs)

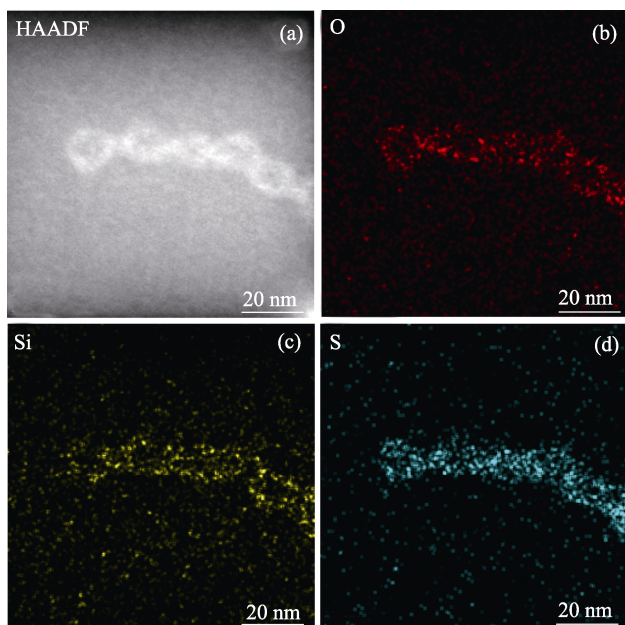


图 4 FPOMs 的面扫描元素分析

Fig. 4 Element mapping scanning images of Flav7-PEGylated-organosilica-micelles (FPOMs)

(a) Image of HAADF; (b-d) Images of O (b), Si (c) and S (d)
The color figures can be obtained from online edition

DLS 结果表明, FMs、FOMs 和 FPOMs 的流体动力学粒径分别为 18.2、24.4 和 28.2 nm, 多分散指数(PDI)分别为 0.232、0.203 和 0.217(图 5), 表明这些纳米粒子在水中具有良好的分散性。而较小尺寸的纳米颗粒将通过肿瘤组织的增强渗透性和滞留(Enhanced Permeability and Retention, EPR)效应来增强其肿瘤靶向和聚集能力^[22]。Zeta 电位测试结果表明(图 6), 氧化硅基杂化胶束 FOMs 的电位较 FMs 有所降低, 这是由于引入了负电性更强的巯基基团(-SH); 而嫁接 PEG 后, FPOMs 的 Zeta 电位又重新升高, 进一步证实了 PEG 分子的成功改性。如图 7 所示, FOMs 和 FPOMs 的红外谱图均在 1050 cm⁻¹ 处出现了 Si-O-Si 的特征吸收峰, 证实了有机氧化硅网络结构的形成。

进一步检测 FPOMs 的 UV-Vis-NIR 吸收光谱(图 8)显示, FPOMs 在水中的吸收峰(~790 nm)相较有机 Flav7 分子在 DMF 中的吸收峰(~1030 nm)有较大蓝移, 而与 Flav7 在水中的吸收光谱更为接近。这是由于 Flav7 分子在水中发生聚集, 导致吸收光谱

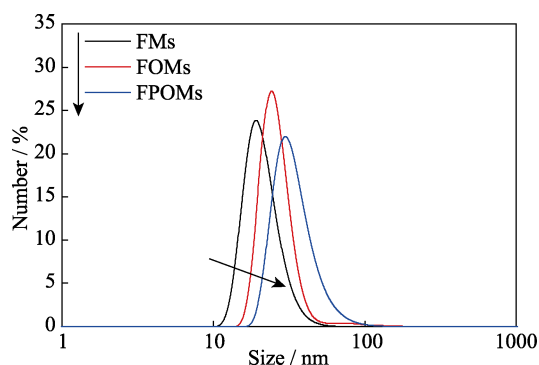


图 5 FMs, FOMs 和 FPOMs 的流体动力学粒径

Fig. 5 Hydrodynamic sizes of FMs, FOMs and FPOMs

FMs: Flav7-micelles; FOMs: Flav7-organosilica-micelles; FPOMs: Flav7-PEGylated-organosilica-micelles

The color figure can be obtained from online edition

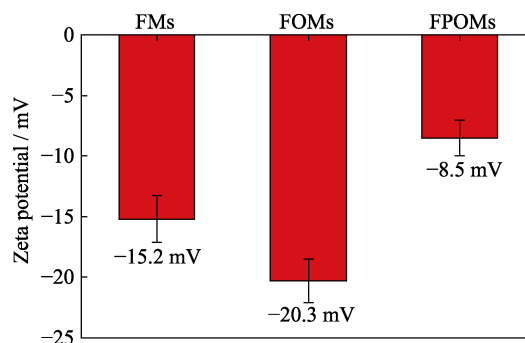


图 6 FMs, FOMs 和 FPOMs 的 Zeta 电位

Fig. 6 Zeta potentials of FMs, FOMs and FPOMs

FMs: Flav7-Micelles; FOMs: Flav7-organosilica-micelles; FPOMs: Flav7-PEGylated-organosilica-micelles

The color figure can be obtained from online edition

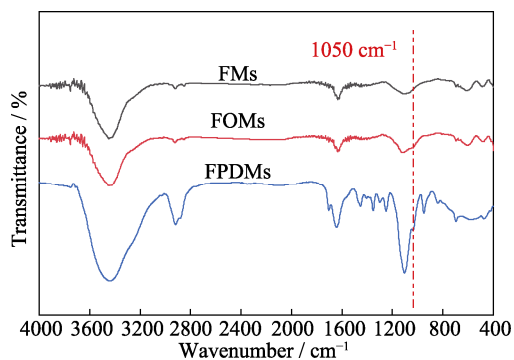


图 7 FMs, FOMs 和 FPOMs 的傅里叶红外光谱图

Fig. 7 FT-IR spectra of FMs, FOMs and FPOMs

FMs: Flav7-Micelles; FOMs: Flav7-organosilica-micelles; FPOMs: Flav7-PEGylated-organosilica-micelles

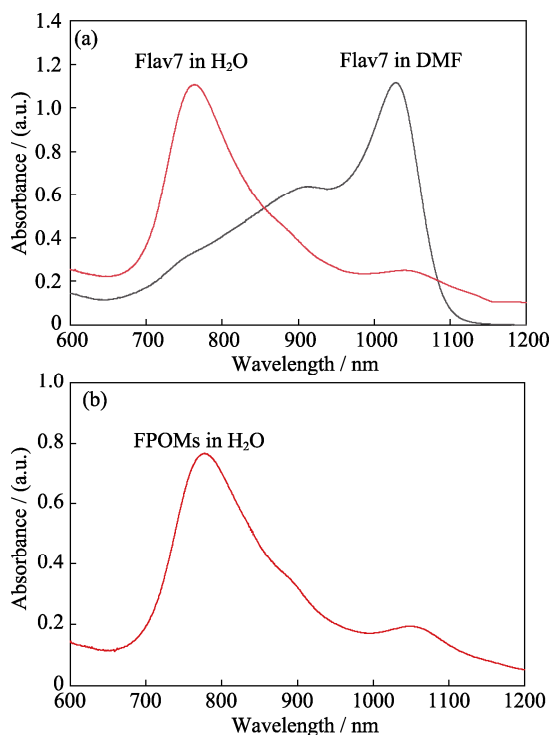


图 8 Flav7(a)和 FPOMs(b)在 DMF 或水中的吸收光谱

Fig. 8 Absorption spectra of Flav7 (a) and FPOMs (b) in DMF or in water

FPOMs: Flav7-PEGylated-organosilica-micelles; DMF: *N,N*-dimethylformamide

改变^[15]。可以推测, FPOMs 内部负载的 Flav7 分子可能为聚集态形式。

2.2 生物稳定性

胶束结构在低于其临界胶束浓度的情况下会发生解离, 进而导致其内部装载的物质提前泄漏^[23]。图 9 为 FMs 和 FPOMs 在四种不同水相中的生物稳定性测试, 可以观察到, FMs 从第 3 天开始动力学粒径出现明显增大, 表明其在这四种水相中均会发生不同程度的团聚现象; 而 FPOMs 在不同的生物环境中的水合动力学粒径基本保持不变, 证实其具有

良好的生物稳定性。如图 10 所示, 当使用 808 nm 波长激光(1.0 W/cm²)持续照射 FPOMs 溶液 1 h 后, 其吸光度几乎没有下降, 表明其具有优良的光稳定性, 不易被光漂白。

2.3 光热性能

实验利用红外热成像仪研究了 FPOMs (600 μg/mL) 在水中的升温情况。如图 11 所示, 在 808 nm 激光(1.0 W/cm²)照射下, FPOMs 水溶液的温

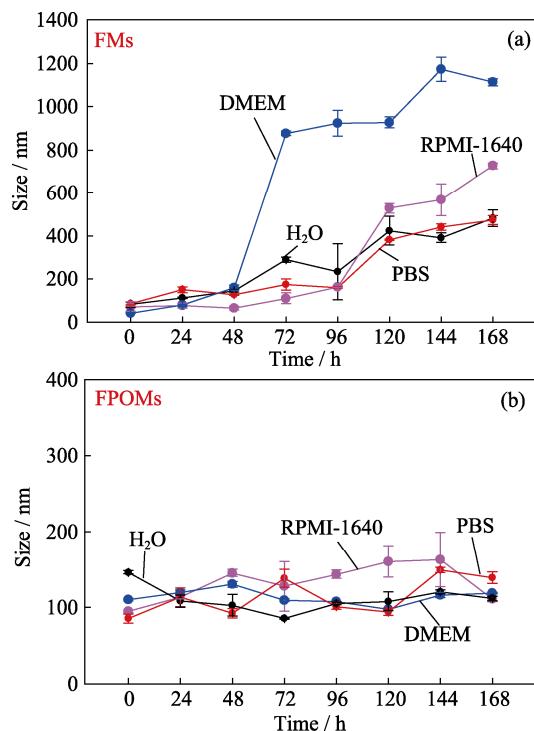


图 9 FMs(a)和 FPOMs(b)在不同生理介质中的流体动力学粒径随时间的变化图

Fig. 9 Hydrodynamic sizes of FMs (a) and FPOMs (b) in H₂O, PBS (pH 7.4), RPMI-1640 medium (10% serum) and DMEM medium (10% serum) for a week

The color figures can be obtained from online edition

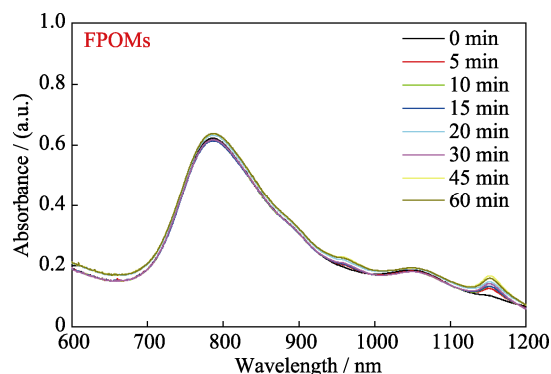


图 10 FPOMs 在 808 nm 激光持续照射 0-60 min 时的吸收光谱

Fig. 10. Absorption spectra of FPOMs under 808 nm laser irradiation for 0-60 min

The color figure can be obtained from online edition

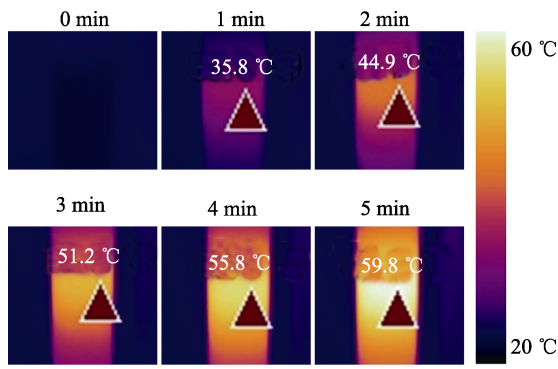


图 11 FPOMs 在 808 nm 激光下的光热转换红外热成像图
Fig. 11 Infrared images of FPOMs under 808 nm laser irradiation

度显著升高。辐照 5 min 后, FPOMs 溶液的温度从 23 °C 迅速上升到 59.8 °C ($\Delta T=36.8$ °C)。此外, FPOMs 水溶液的升温程度与溶液浓度和激光功率密度呈正相关, 揭示了其可控的光热行为^[24](图 12)。

如图 13 所示, 在激光照射(808 nm, 1.0 W/cm²)下, 经历反复 10 次的加热冷却循环后(每个循环激光照射 300 s, 之后自然冷却至 30 °C 左右)FPOMs 水溶液(600 $\mu\text{g/mL}$)依然能保持稳定的光热转换能力。相比于其它菁染料光热剂体系^[25-26], FPOMs 展现出优异的光热稳定性; 相比之下, 纯 Flav7 的水溶液

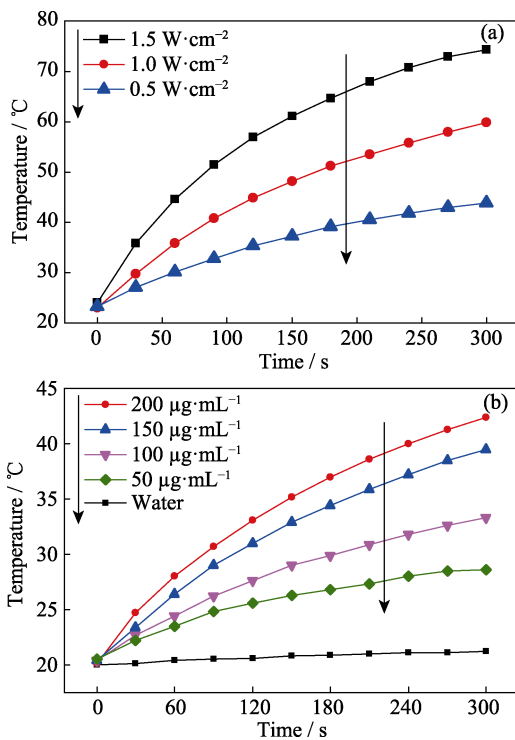


图 12 FPOMs 的光热性能
Fig. 12 Photothermal property of FPOMs
(a) FPOMs (600 $\mu\text{g/mL}$) under different power densities of 808 nm laser irradiation; (b) FPOMs at different concentrations under 808 nm (1.0 W/cm²) laser irradiation
The color figures can be obtained from online edition

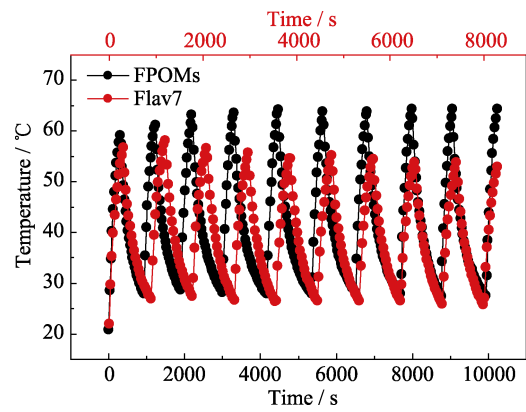


图 13 FPOMs 和 Flav7 在水中的光热稳定性
Fig. 13 Photothermal stability of FPOMs and Flav7 in water
The color figure can be obtained from online edition

则表现出明显的下降, 进一步证明了氧化硅基杂化稳定的胶束结构可明显改善 Flav7 的光热稳定性。

进一步, 以功率密度 1.0 W/cm² 的波长 808 nm 激光照射体积为 1 mL FPOMs 水溶液研究 FPOMs 的光热转换效率。如图 14 所示, FPOMs 水溶液由于激光的持续照射逐渐升温, 最后逐渐趋于最高稳态温度。随后, FPOMs 水溶液达到的最高温度为 57.1 °C, 根据自然冷却的时间, 利用光热转换效率公式计算出 FPOMs 的光热转换效率约为 46.7%, 优于其它有机小分子光热剂体系^[27-29]。

2.4 FPOMs 的细胞毒性

首先, 采用 CCK-8 法检测 FPOMs 对 MEF 正常细胞、3T3 正常细胞和 SMMC-7721 肿瘤细胞的毒性效应。如图 15(a, b)所示, 在没有 808 nm 激光照射的情况下, FPOMs 在 0~300 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内对三种细胞的影响可以忽略不计, 表明这些纳米胶束具有良好的生物相容性。如图 15(a)所示, 受激光 (808 nm, 1.0 W/cm²) 照射后, 肿瘤细胞的相对存活

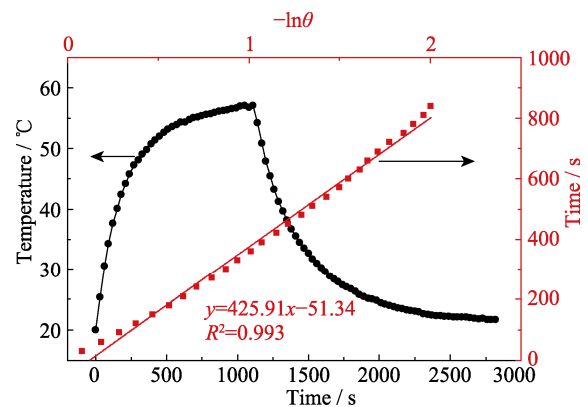


图 14 FPOMs 的光热转换效率(1.0 W/cm², 808 nm)
Fig. 14 Photothermal conversion efficiency of FPOMs (1.0 W/cm², 808 nm)
The color figure can be obtained from online edition

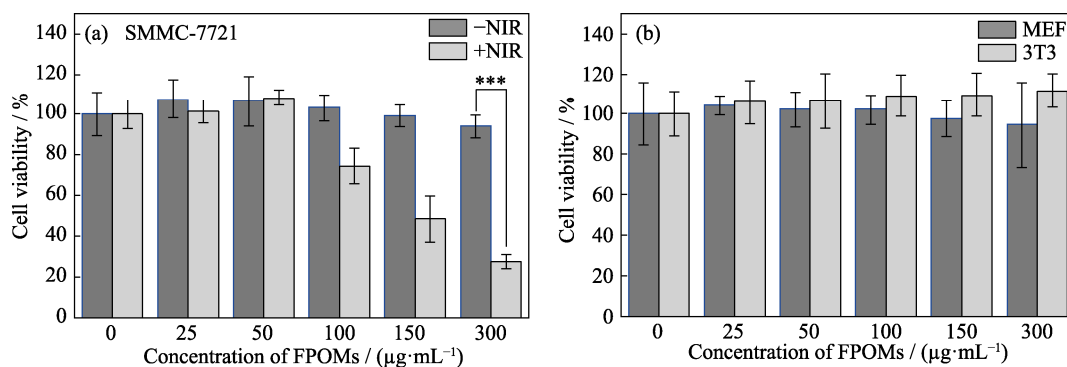


图 15 FPOMs 处理后的细胞经激光照射后的细胞存活率

Fig. 15 Relative cell viabilities of FPOMs treated cells after laser irradiation at 808 nm ($1.0\text{ W}/\text{cm}^2$) for 5 min

(a) SMMC-7721 cancer cells with or without laser irradiation (** $p < 0.001$); (b) MEF and 3T3 cells

The color figures can be obtained from online edition

率呈现与 FPOMs 浓度相关的下降趋势, FPOMs 的浓度越高, 肿瘤细胞的存活率越低。当 FPOMs 浓度为 $300\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 约有 73% 的肿瘤细胞被杀死。

进一步采用流式细胞仪分析不同处理方法下 SMMC-7721 细胞的坏死情况。其中对照组(不做任何处理)、NIR 组(仅施加近红外激光治疗)和 FPOMs 组(仅加入 FPOMs)的细胞坏死率分别仅约为 4.5%、4.6%和 3.9%, 而 FPOMs+NIR 实验组(加入 FPOMs 后施加激光治疗)的细胞坏死率显著增加到 53.7% (图 16)。这些结果证实了 FPOMs 具有高效的光热毒

性和良好的生物相容性。此外, 用钙黄绿素-AM (Calcein-AM)和碘化丙啶(PI)分别对活细胞和死亡细胞进行染色。如图 17 所示, 在没有 808 nm 激光照射的情况下, 所有细胞都表现出强烈的绿色荧光, 表明 FPOMs 在不施加近红外激光的情况下几乎没有细胞毒性。而经 808 nm 激光($1.0\text{ W}/\text{cm}^2$)照射 5 min 后, 与浓度为 $300\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FPOMs 共孵育的肿瘤细胞几乎被完全杀死, 且死亡细胞和活细胞的边界清晰可见(激光器的光斑所致), 进一步表明 FPOMs 具有显著的细胞光热毒性。

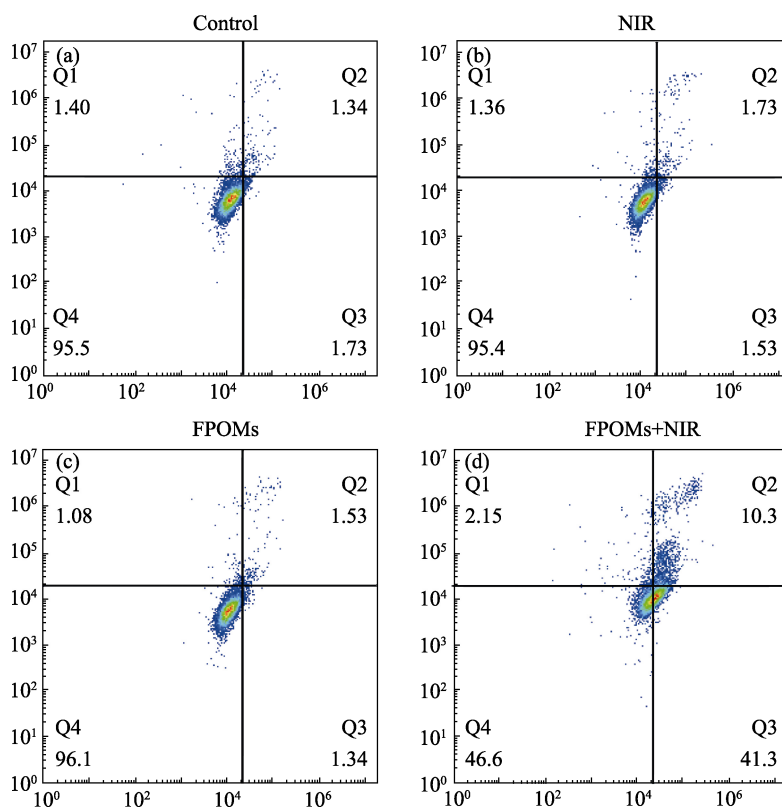


图 16 流式细胞仪分析 SMMC-7721 细胞经不同处理并染色后的细胞凋亡

Fig. 16 Flow cytometry analysis of SMMC-7721 cells with different treatment and staining by Annexin-V/PI reagents

(a) Control; (b) Laser irradiation only; (c) FPOMs only; (d) FPOMs and laser irradiation

The color figure can be obtained from online edition

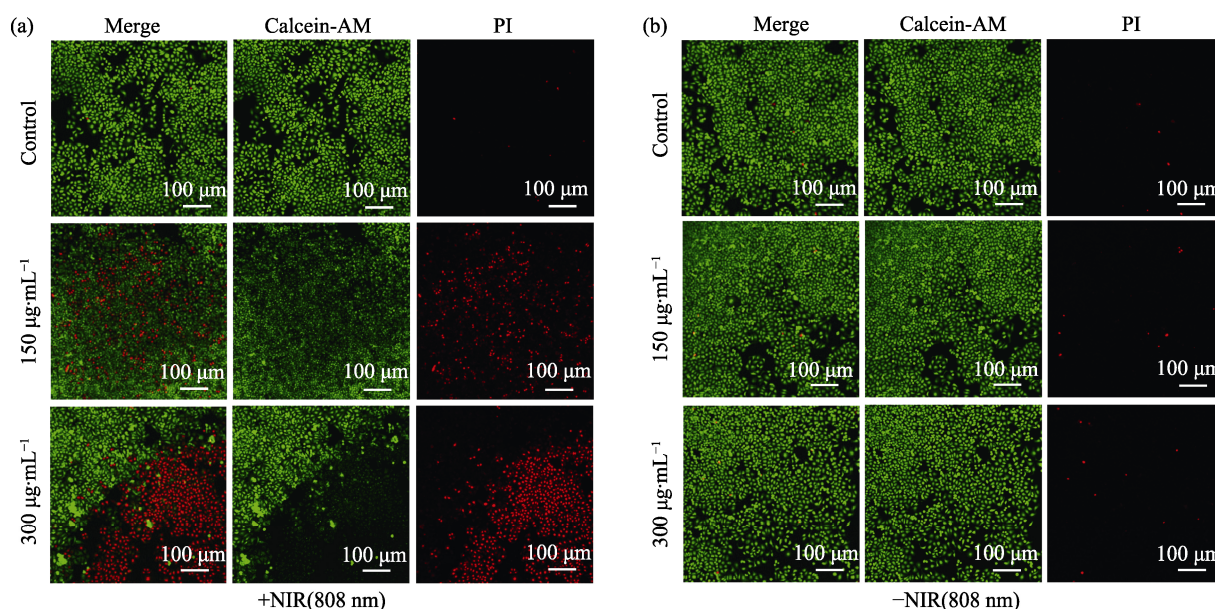


图 17 SMMC-7721 细胞与不同浓度 FPOMs 共孵育后的激光共聚焦显微镜照片

Fig. 17 Confocal laser scanning microscope images of SMMC-7721 cells with FPOMs (0, 150, and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treated by (a) or not by (b) laser irradiation (808 nm, $1.0 \text{ W}/\text{cm}^2$, 5 min).

The color figures can be obtained from online edition

3 结论

本研究发展了一种简便的方法, 构建了负载小分子光热剂 Flav7 的氧化硅基杂化胶束体系, 用于高效的生物光热治疗研究。所得到的 FPOMs 具有良好的均一性和分散性, 且在生理环境下可稳定 1 周。此外, FPOMs 还具有良好的光热转换能力和优异的光热稳定性(经 10 个光照升温降温循环后依然能保持稳定的光热转换能力), 其光热转换效率可达 46.7%, 且光稳定性好。细胞实验进一步证实了 FPOMs 不仅具有良好的生物相容性, 且在 808 nm 激光照射下, 其对肿瘤细胞表现出显著的细胞毒性。FPOMs 有望作为一种新型的纳米光热试剂用于肿瘤等疾病的光热治疗。

参考文献:

- [1] XU C, PU K. Second near-infrared photothermal materials for combinational nanotheranostics. *Chemical Society Reviews*, 2021, **50**(2): 1111–1137.
- [2] ZHI D, YANG T, O'HAGAN J, *et al.* Photothermal therapy. *Journal of Controlled Release*, 2020, **325**: 52–71.
- [3] JUNG H S, VERWILST P, SHARMA A, *et al.* Organic molecule-based photothermal agents: an expanding photothermal therapy universe. *Chemical Society Reviews*, 2018, **47**(7): 2280–2297.
- [4] CHEN Y W, SU Y L, HU S H, *et al.* Functionalized graphene nanocomposites for enhancing photothermal therapy in tumor treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, **105**: 190–204.
- [5] LIU Y, BHATTARAI P, DAI Z, *et al.* Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer.

Chemical Society Reviews, 2019, **48**(7): 2053–2108.

- [6] HUANG X, JAIN P K, EL-SAYED I H, *et al.* Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*, 2008, **23** (3): 217–228.
- [7] LI J, RAO J, PU K. Recent progress on semiconducting polymer nanoparticles for molecular imaging and cancer phototherapy. *Biomaterials*, 2018, **155**: 217–235.
- [8] SONG X, CHEN Q, LIU Z. Recent advances in the development of organic photothermal nano-agents. *Nano Research*, 2015, **8**(2): 340–354.
- [9] RAJORA M, LOU J, ZHENG G. Advancing porphyrin's biomedical utility via supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews*, 2017, **46**(21): 6433–6469.
- [10] DOANE T L, BURDA C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society Reviews*, 2012, **41**(7): 2885–2911.
- [11] ZOU L, WANG H, HE B, *et al.* Current approaches of photothermal therapy in treating cancer metastasis with nanotherapeutics. *Theranostics*, 2016, **6**(6): 762–772.
- [12] DOUGHTY A C, HOOVER A R, LAYTON E, *et al.* Nanomaterial applications in photothermal therapy for cancer. *Materials*, 2019, **12**(5): 779–14.
- [13] WANG H, CHANG J, SHI M, *et al.* A dual-targeted organic photothermal agent for enhanced photothermal therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, **131**(4): 1069–1073.
- [14] CHENG Q, TIAN Y, DANG H, *et al.* Antiquenching macromolecular NIR-II probes with high-contrast brightness for imaging-guided photothermal therapy under 1064 nm irradiation. *Advanced Healthcare Materials*, 2022, **11**: 2101697–10.
- [15] COSCO E D, CARAM J R, BRUNS O T, *et al.* Flavylum polymethine fluorophores for near- and shortwave infrared imaging. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, **56**(42): 13126–13129.
- [16] LI T, LI C, RUAN Z, *et al.* Polypeptide-conjugated second near-infrared organic fluorophore for image-guided photothermal therapy. *ACS Nano*, 2019, **13** (3): 3691–3702.

- [17] NIU D, LI Y, MA Z, *et al.* Preparation of uniform, water-soluble, and multifunctional nanocomposites with tunable sizes. *Advanced Functional Materials*, 2010, **20** (5): 773–780.
- [18] FADDA A, EL-MEKAWY R E. Utility of quaternary ammonium salts in synthesis of some novel cyanine dyes as potential antibacterial and antitumor agents. *Dyes and Pigments*, 2013, **99**(2): 512–519.
- [19] ROPER D K, AHN W, HOEPFNER M. Microscale heat transfer transduced by surface plasmon resonant gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 2007, **111**: 3636–3641.
- [20] OSS-RONEN L, SCHMIDT J, ABETZ V, *et al.* Characterization of block copolymer self-assembly: from solution to nanoporous membranes. *Macromolecules*, 2012, **45**(24): 9631–9642.
- [21] NIU D, LI Y, SHI J. Silica/organosilica cross-linked block copolymer micelles: a versatile theranostic platform. *Chemical Society Reviews*, 2017, **46**(3): 569–585.
- [22] MALDINEY T, RICHARD C, SEGUIN J, *et al.* Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice. *ACS Nano*, 2011, **5** (2): 854–862.
- [23] FENG H, LU X, WANG W, *et al.* Block copolymers: synthesis, self-assembly, and applications. *Polymers (Basel)*, 2017, **9**(10): 494–524.
- [24] JIANG Z, ZHANG C, WANG X, *et al.* A borondifluoride-complex-based photothermal agent with an 80% photothermal conversion efficiency for photothermal therapy in the NIR-II window. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, **60**(41): 22376–22384.
- [25] WANG Y, NIU C, FAN S, *et al.* Indocyanine green loaded modified mesoporous silica nanoparticles as an effective photothermal nanopatform. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**: 4789–15.
- [26] DING Y, WANG C, LU B, *et al.* Enhancing the stability and photothermal conversion efficiency of ICG by pillar[5]arene-based host-guest interaction. *Frontiers in Chemistry*, 2021, **9**: 775436–8.
- [27] LI C, LIN W, LIU S, *et al.* Structural optimization of organic fluorophores for highly efficient photothermal therapy. *Materials Chemistry Frontiers*, 2021, **5**(1): 284–292.
- [28] YOON H J, LEE H S, LIM J Y, *et al.* Liposomal indocyanine green for enhanced photothermal therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, **9**(7): 5683–5691.
- [29] QIAN H, CHENG Q, TIAN Y, *et al.* An anti-aggregation NIR-II heptamethine-cyanine dye with a stereo-specific cyanine for imaging-guided photothermal therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, **9**(11): 2688–2696.