

pH 响应铜掺杂介孔硅纳米催化剂增强肿瘤 化疗-化学动力学联合治疗的研究

何倩, 唐婉兰, 韩秉锐, 魏佳元, 吕文轩, 唐昭敏

(西南石油大学 新能源与材料学院, 成都 610500)

摘要: 化学动力学疗法(CDT)利用肿瘤细胞内源性 H_2O_2 与芬顿催化剂反应生成高毒性的羟基自由基($\bullet OH$), 从而杀死肿瘤细胞, 但内源性 H_2O_2 不足和纳米粒子转运效率较低导致抗癌效果不理想。本研究制备了一种分散性良好、尺寸较小的铜掺杂介孔二氧化硅(Cu-MSN), 负载化疗药物阿霉素(DOX)和抗坏血酸盐(AA)后, 表面经叶酸(FA)和二甲基马来酞酸(DMMA)改性的壳聚糖(FA-CS-DMMA)以及羧甲基壳聚糖(CMC)包裹, 得到 pH 响应型靶向纳米催化剂 FA-CS-DMMA/CMC@Cu-MSN@DOX/AA(缩写为 FCDC@Cu-MSN@DA)。扫描电镜显示纳米粒子 FCDC@Cu-MSN@DA 粒径约为 100 nm。体外 48 h 内 Cu^{2+} 释放量可达 80%, 药物 DOX 释放达到 57.3%。释放的 AA 经自氧化后产生 H_2O_2 , 诱导 Cu^{2+} 发生类芬顿反应, 从而增强 CDT。细胞实验证明, FCDC@Cu-MSN@DA 联合化疗药物表现出优异的抗肿瘤活性, 说明该多功能纳米催化剂在癌症治疗中具有潜在应用前景。

关键词: 癌症治疗; 铜离子; 过氧化氢; 纳米催化剂; 化学动力学疗法

中图分类号: TQ174 文献标志码: A 文章编号: 1000-324X(2024)01-0090-09

pH Responsive Copper-Doped Mesoporous Silica Nanocatalyst for Enhanced Chemo-Chemodynamic Tumor Therapy

HE Qian, TANG Wanlan, HAN Bingkun, WEI Jiayuan, LÜ Wenxuan, TANG Zhaomin

(School of New Energy and Materials, Southwest Petroleum University, Chengdu 610500, China)

Abstract: Chemodynamic therapy (CDT) uses endogenous H_2O_2 of tumor cells to react with Fenton catalysts to generate highly toxic hydroxyl radical ($\bullet OH$), thereby killing cancer cells. However, the insufficient endogenous H_2O_2 and low transport efficiency of nanoparticles result in unsatisfactory anticancer efficacy. Here, we successfully synthesized a Cu^{2+} doped mesoporous silica nanoparticles (Cu-MSN) with excellent dispersity and small size. After loaded with doxorubicin (DOX) and ascorbate (AA), Cu-MSN was coated with folic acid (FA), dimethyl maleic anhydride (DMMA) modified chitosan (FA-CS-DMMA) and carboxymethyl chitosan (CMC) to obtain a pH responsive targeted nanocatalyst FCDC@Cu-MSN@DA. SEM images showed that particle size of FCDC@Cu-MSN@DA was about 100 nm. After 48 h *in vitro*, cumulative amount of Cu^{2+} release reached 80% and DOX release was about 57.3%

收稿日期: 2023-03-23; 收到修改稿日期: 2023-04-24; 网络出版日期: 2023-09-12

基金项目: 国家自然科学基金(51803174); 四川省玄武岩纤维复合材料开发及应用工程技术研究中心开放基金(2022SCXWYXWFC002)

National Natural Science Foundation of China (51803174); Foundation of Sichuan Engineering Technology Research Center of Basalt Fiber Composite Development and Application of Southwest Petroleum University (2022SCXWYXWFC002)

作者简介: 何倩(1999-), 女, 硕士研究生. E-mail: 1084518887@qq.com

HE Qian (1999-), female, Master candidate. E-mail: 1084518887@qq.com

通信作者: 唐昭敏, 高级实验师. E-mail: tl8687@163.com

TANG Zhaomin, senior experimentalist. E-mail: tl8687@163.com

in the acidic environment. After oxidation of AA, the produced exogenous H_2O_2 induced Cu^{2+} to catalytic the Fenton-like reaction, which enhanced the therapeutic effect of tumor chemodynamic therapy (CDT). Cell experiments *in vitro* demonstrated that FCDC@Cu-MSN@DA exhibited excellent anticancer ability in the combination of CDT and chemotherapy. This multifunctional nanocatalyst has great potential application in cancer therapy in the future.

Key words: tumor therapy; copper iron; hydrogen peroxide; nanocatalyst; chemodynamic therapy

纳米催化剂作为纳米催化和纳米医学的结合, 具有高选择性和催化活性^[1], 它通过芬顿或类芬顿反应生成具有细胞毒性的活性氧 (Radical Oxygen Species, ROS), 在现代纳米医学领域取得了显著进展^[2-3]。基于芬顿反应原理的纳米催化剂已应用于化学动力学治疗 (Chemodynamic Therapy, CDT) 和纳米催化治疗 (Nanocatalytic Therapy, NCT)^[4]。其中, 一些过渡金属离子 (Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+}) 表现出优异的芬顿催化活性^[5]。将过渡金属离子与多孔结构 (如金属-有机框架 (MOF)、介孔二氧化硅等) 结合^[6-7], 利用含过渡金属的多孔材料作为催化剂在肿瘤部位生成有细胞毒性的 ROS, 如羟基自由基 ($\cdot OH$), 已经被证明具有理想的肿瘤治疗效果^[8]。

CDT 的治疗效果通常取决于芬顿反应的强度, 以及 ROS 的浓度, ROS 含量不足反而会促进肿瘤生长和转移^[9]。然而, 作为芬顿反应的重要底物, 肿瘤细胞内源性 H_2O_2 (100 $\mu mol/L$) 仍不足以产生足量的 $\cdot OH$ ^[10], 是限制 CDT 疗效的重要因素。抗坏血酸盐 (Ascorbic Acid, AA) 被认为是一种优异的抗氧化剂, 随着 AA 被发现有抗癌作用^[11], 其促氧化特性和治疗潜力引起了广泛关注。AA 的药理学浓度 (0.3~20 mmol/L) 被证明能够选择性地杀死癌细胞, 这是因为添加抗坏血酸后癌细胞中 H_2O_2 含量增加^[12]。Yang 等^[13]制备的 Fe^{3+} 掺杂的中空介孔二氧化硅负载抗坏血酸中, Si-O-Fe 骨架杂化纳米粒子不仅能实现酸刺激触发的降解和抗坏血酸释放, 而且能提供丰富的铁离子源, 催化抗坏血酸氧化产生 H_2O_2 来诱导芬顿反应。Ai 等^[14]合成了金属-配体纳米酶, 由于纳米酶具有较大的比表面积和原子利用率, 能有效加速抗坏血酸盐氧化产生 H_2O_2 , 从而提高了癌细胞的消融效果。但这些 Fe 基抗坏血酸纳米催化剂的芬顿反应的激活条件受到诸多限制, 如严格的酸性条件 (pH 3~4)^[15-16], 以及胞内存在的高浓度谷胱甘肽 (GSH ≈ 10 mmol/L)^[17-18] 会导致生成的 $\cdot OH$ 在杀死肿瘤细胞之前就被部分 GSH 清除, 上述都是铁基材料抑制 CDT 疗效的因素。

相比之下, 铜基纳米材料对芬顿反应则没有这

些限制, 可在更宽的 pH 范围内实现^[1,5,19-21]。此外, Cu^{2+} 能与肿瘤内过度表达的 GSH 快速反应, 降低细胞内 GSH 水平。因此, 本研究选择 CDT 反应效率更高、治疗效果可能更好的铜基纳米材料作为基底, 制备 Cu^{2+} 掺杂的介孔二氧化硅 (Cu-MSN) 作为药物载体, 负载阿霉素 (DOX) 和 AA, 然后在其表面修饰叶酸 (FA)-壳聚糖 (CS)-马来酸酐 (DMMA) 和羧甲基壳聚糖 (CMC), 得到纳米催化剂 FA-CS-DMMA/CMC@Cu-MSN@DOX/AA。纳米载药催化剂在肿瘤弱酸性环境发生电荷逆转, 暴露出带正电的纳米粒子与 4T1 肿瘤细胞表面过表达的叶酸受体 (FR) 特异性结合进入细胞, 在肿瘤细胞内触发结构降解, 并快速释放出 AA、 Cu^{2+} 和 DOX, AA 自氧化产生外源性 H_2O_2 , 细胞内 GSH 将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , 随后 Cu^+ 与 AA 自氧化产生的外源性 H_2O_2 发生类芬顿催化反应生成强细胞毒性物质 $\cdot OH$, 协同化疗药物 DOX 高效杀死癌细胞。该 pH 响应型靶向纳米催化剂为高效治疗癌症提供了一种有价值的新途径。

1 实验方法

1.1 药品及试剂

氨水 ($NH_3 \cdot H_2O$)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、正硅酸乙酯 (TEOS)、三水硝酸铜 ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$)、盐酸 (HCl)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、三乙胺 (TEA)、二甲基亚砜 (DMSO) 购于成都科隆化工有限公司; 盐酸阿霉素 (DOX·HCl)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、2,3-二甲基马来酸酐 (DMMA)、抗坏血酸钠 (AscHNa) 购于上海阿拉丁生化科技有限公司; FA、CS (低分子量, 脱乙酰度 90%)、CMC (取代度 $\geq 85\%$)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 均购于上海麦克莱恩生化科技有限公司。

1.2 Cu-MSN 的合成

将 0.5 g 模板剂 CTAB 溶解在含有氨水和乙醇的蒸馏水中, 在 70 $^{\circ}C$ 水浴条件下搅拌 20 min。然后, 将 1.5 g TEOS 和 50 mg $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ 溶解于 25 mL

乙醇中,滴入上述混合物后,继续搅拌 8 h。随后,离心 20 min 获得沉淀产物,用乙醇洗涤数次去除残留物。最后,加入盐酸和乙醇的混合液($V_{\text{HCl}}:V_{\text{EtOH}}=1:9$)去除模板剂,并在 70 °C 下冷凝回流 10 h,真空干燥得到 Cu-MSN。

1.3 药物负载及 CS 衍生物包覆

将 Cu-MSN 分散在 DMSO 中,加入 DOX·HCl 和 TEA,避光搅拌过夜,离心去除多余 DOX,再将 Cu-MSN@DOX、AA 分散在去离子水中避光搅拌 12 h,最后冷冻干燥收集 Cu-MSN@DA。

将 290 mg EDC、240 mg NHS、900 mg FA 分散在 DMSO 溶液反应 2 h,活化 FA 羧基,用冷乙醚去除副产物。将活化后 FA 缓慢添加到壳聚糖醋酸水溶液(0.1 mol/L)中避光反应 16 h,加入 NaOH 调节 pH 至 8.5 左右。离心后用异丙醇洗涤,磷酸缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)透析得到 FA-CS,再将其溶解于 DMSO 中,加入 1.152 g DMMA 和 300 μL TEA 反应 24 h。透析纯化去除多余 DMMA,冷冻干燥获得 FA-CS-DMMA。将 FA-CS-DMMA 和 CMC 分别配制为 0.4 和 2 mg/mL 的母液,各取 0.5 mL 混合后加入 1 mL Cu-MSN@DA 溶液(1 mg/mL)避光反应 12 h。高速离心后冷冻干燥得到 FA-CS-DMMA/CMC@Cu-MSN@DOX/AA (记作 FCDC@Cu-MSN@DA)。

1.4 材料表征

使用扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM, ZEISS Sigma500)观察 FCDC@Cu-MSN@DA 形貌,并对组成元素进行元素能量分布面描分析(Energy Dispersive Spectrometer Mapping, EDS mapping),使用 X 射线光电子能谱仪(X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS, Thermo ESCALAB 250XI)表征 FCDC@Cu-MSN@DA 中铜的价态。使用电子自旋共振能谱(Electron Spin Resonance Spectroscopy, ESR, Bruker EMX PLUS)测定 FCDC@Cu-MSN@DA 样品所产生的 ROS 种类。

1.5 pH 响应释放行为

将 2 mL 浓度为 1 mg/mL 的 FCDC@Cu-MSN@DA 溶液转入不同 pH(7.4、6.5 或 5.0)的缓冲液中,在 37 °C、100 r/min 条件下震荡。在预定时间间隔(0.5、1、2、4、8、12、24、36 和 48 h)收集缓冲液,通过电感耦合等离子体发射光谱(ICP-OES)检测所释放的铜离子量;使用紫外-可见分光光度计测定溶液在 480 nm 处的吸光强度,并根据标准曲线计算药物释放量。

1.6 化学动力学性能表征

使用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色反应考察·OH 的生成。将含有 TMB 的 PBS(pH 5.0)分别与 Cu-MSN+ H_2O_2 、FCDC@Cu-MSN@DA、AA 和 H_2O_2 混合。用紫外-可见吸收光谱法测定溶液在 370 nm 处的吸光度变化。

1.7 细胞内吞

为了评价不同细胞对材料的吞噬性能,将 A549、MCF-7 和 4T1 肿瘤细胞以 1×10^5 cells/well 的密度接种在 6 孔板中,加入 FCDC@Cu-MSN@DA 共培养 5 h。使用 4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)染色细胞核,微丝绿色荧光探针(Actin-Tracker Green)染色细胞骨架,最后通过激光共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM, Nikon A1)观察细胞对 FCDC@Cu-MSN@DA 等材料的吞噬。

1.8 细胞内活性氧测试

将 4T1 细胞以 1×10^5 cells/well 的密度接种在 6 孔板上并孵育过夜。然后,加入实验组(1) PBS、(2)游离 DOX、(3) FCDC@Cu-MSN@D、(4) FCDC@Cu-MSN@A、(5) FCDC@Cu-MSN@DA、(6) FCDC@Cu-MSN@DA 溶液(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)并进一步培养。之后,用 DCFH-DA 荧光探针对 4T1 细胞染色 15 min,最后,通过倒置荧光显微镜观察细胞内 ROS 情况。

1.9 细胞相容性

采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)比色法考察 Cu-MSN 和 FCDC@Cu-MSN 的细胞相容性。将 EC 细胞、4T1 细胞以 4×10^3 cells/well 的密度接种在 96 孔板并孵育过夜,加入不同浓度(20, 40, 80, 120, 160, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 Cu-MSN 和 FCDC@Cu-MSN 培养 24 h,加入 MTT 处理后用酶标仪(Thermo)测定溶液在 490 nm 处的 OD 值。

1.10 FCDC@Cu-MSN@DA 化疗-化学动力学联合治疗效果

用 MTT 比色法考察细胞毒性。将 4T1 细胞接种在 96 孔板中培养 24 h,加入实验组(1)PBS、(2)游离 DOX、(3)FCDC@Cu-MSN@D、(4) FCDC@Cu-MSN@A、(5)FCDC@Cu-MSN@DA、(6) FCDC@Cu-MSN@DA 共同孵育 24 h 后加入 MTT,用酶标仪测定 OD 值。

采用活/死细胞染色法考察不同材料处理后细胞的凋亡情况。将 4T1 细胞以 2×10^4 cells/well 的密度接种于 48 孔板,孵育 24 h,加入各组材料处理 24 h,用钙黄绿素(Calcein-AM)和碘化丙啶(PI)染色,最后用倒置荧光显微镜观察和拍照。

2 结果与讨论

2.1 纳米催化剂的制备与表征

利用合成 Cu-MSN 的孔道负载化疗药物 DOX 和 AA, 得到双载药纳米颗粒 Cu-MSN@DOX/AA, 最后通过静电作用将多功能靶向壳聚糖衍生物 (FA-CS-DMMA) 和羧甲基壳聚糖 (CMC) 修饰在 Cu-MSN@DOX/AA 表面得到 FCDC@Cu-MSN@DOX/AA (图 1)。纳米粒子表面 CS-DMMA 之间的 β 羧酸酰胺

键在胞外微环境中断裂实现电荷逆转; FA 与肿瘤细胞表面过表达的叶酸受体 (FR) 特异性识别后, 将纳米粒子内吞入细胞, 在酸性环境下发生降解并释放 AA, Cu^{2+} 和 DOX; AA 通过自氧化产生外源性 H_2O_2 而增强 CDT 疗效; 随后 Cu^{2+} 被局部高浓度 GSH 还原为 Cu^+ ; 最后 Cu^+ 与外源性 H_2O_2 进行类芬顿反应, 生成强细胞毒性的 $\cdot\text{OH}$, 协同化疗药物 DOX 杀死癌细胞。

采用 SEM 和 HAADF-STEM 观察纳米催化剂的形貌和检测元素组成, 结果如图 2(A) 所示。Cu-MSN

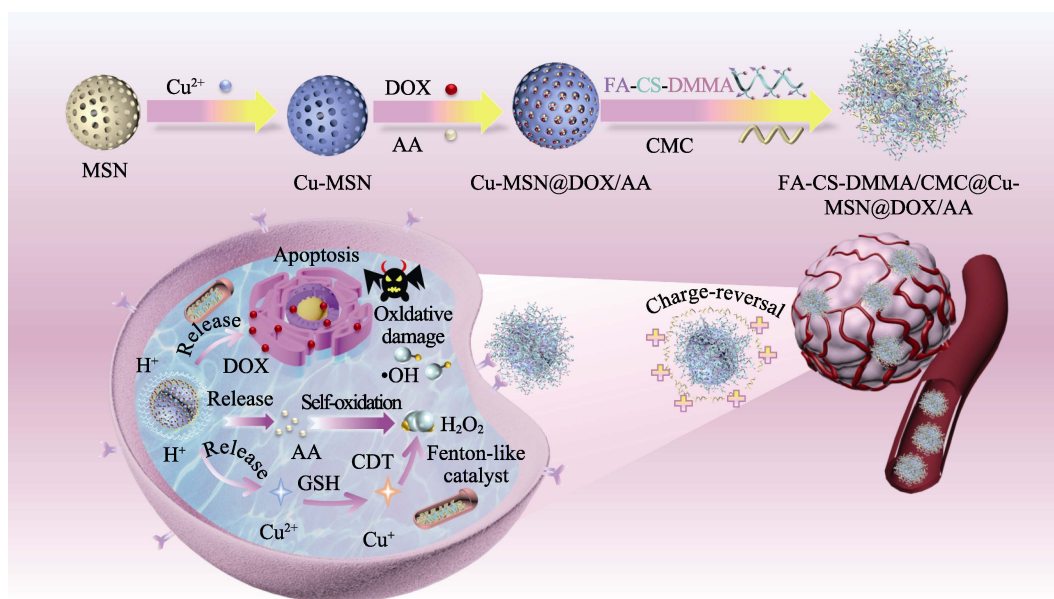


图 1 FCDC@Cu-MSN@DOX/AA 纳米催化剂的制备及增强放大 CDT 与化疗协同作用的示意图
Fig. 1 Schematic illustration of synthetic procedure and mechanism for enhanced chemo-CDT of nanocatalyst FCDC@Cu-MSN@DOX/AA

MSN: Mesoporous silica; DOX: Doxorubicin; AA: Ascorbic acid; FA: Folic acid; CS: Chitosan; DMMA: Dimethyl maleic anhydride; CMC: Carboxymethyl chitosan; CDT: Chemodynamic therapy

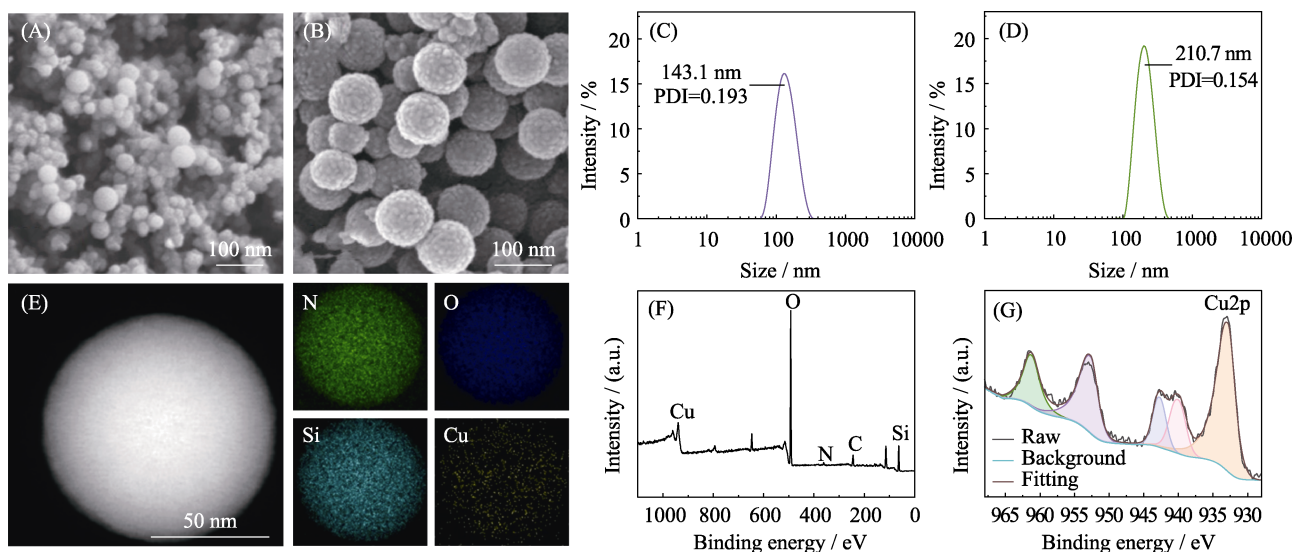


图 2 Cu-MSN 和 FCDC@Cu-MSN@DOX/AA 的表征

Fig. 2 Characterization of Cu-MSN and FCDC@Cu-MSN@DOX/AA
(A, B) SEM images of Cu-MSN (A) and FCDC@Cu-MSN@DOX/AA (B); (C, D) Size distributions of Cu-MSN (C) and FCDC@Cu-MSN@DOX/AA (D); (E) Elemental (N, O, Si, and Cu) mappings of Cu-MSN; (F) XPS full survey of Cu-MSN; (G) High resolution XPS analysis on Cu₂p of Cu-MSN; Colorful figures are available on website

为直径约 50 nm 的球形, 而 FCDC@Cu-MSN@DA 为平均粒径 100 nm、分散性良好的球形颗粒, 表面修饰后呈现花瓣状结构(图 2(B)). 从纳米颗粒的元素映射图像(图 2(E))可以看出, 铜掺杂后 Cu-MSN 中 N、O、Si 和 Cu 四种元素均匀分布. 通过 ICP-OES 检测出 Cu-MSN 中 Cu^{2+} 含量约为 3.3%.

如图 2(F)所示, XPS 全谱表明主要组成元素中存在明显的 Cu2p 峰^[22-23]. Cu2p 的高分辨 XPS 图谱分析显示(图 2(G)), 在 933.5 和 953.1 eV 存在两个主峰, 并且在 962.6 和 943.8 eV 处有两个卫星峰, 表明铜处于二价氧化态(Cu^{2+}), 再次证明 Cu^{2+} 成功掺入 MSN 结构中形成了 Si-O-Cu 键.

2.2 pH 响应性

FCDC@Cu-MSN@DA 在肿瘤弱酸环境中易发生降解. 采用模拟正常组织液和肿瘤组织内及肿瘤细胞溶酶体溶液三种不同 pH 缓冲液对 FCDC@Cu-MSN@DA 和 Cu-MSN 作浸泡处理, 利用纳米粒度仪测定 Zeta 电位, 结果如图 3(A)所示. 在三种不同缓冲溶液中, 与单独的纳米载体 Cu-MSN 相比, 肿瘤细胞外弱酸性环境下(pH 6.0~6.5), FCDC@Cu-MSN@DA 中 CMC 质子化和 CS-DMMA 之间的 β 羧酰胺键断裂^[24], 其表面发生电荷反转, 纳米粒子的电位从 -10.97 mV 增加到 8.73 mV, 最后

在溶酶体酸性环境下(pH 5.0)结构完全解离.

FCDC@Cu-MSN@DA 中化疗药物 DOX 负载率为 16.52%, 包封率为 99.16%, AA 负载率和包封率分别为 39.73%和 99.33%. 当 FCDC@Cu-MSN@DA 在肿瘤细胞内完全裂解后, 掺入的 Cu^{2+} 和药物 DOX 会被快速释放, 如图 3(B,C). 从药物释放曲线可以看出, 与正常生理环境(pH 7.4)和模拟肿瘤胞外微环境(pH 6.5)相比, 胞内的弱酸环境(pH 5.0)更有利于 DOX 的释放. FCDC@Cu-MSN@DA 在 pH 5.0 的缓冲液中, 24 h 后 DOX 的释放量可达到 58.3%; 然而在 pH 7.4 和 pH 6.5 的缓冲液中, DOX 释放率不超过 10%. 此外, 通过考察不同时间间隔下 AA 在不同 pH 缓冲液中的释放情况(图 3(D)), 在 pH 5.0 的缓冲液中 AA 的释放量最大接近 80%, 明显高于在中性环境(pH 7.4)和弱酸性环境(pH 6.5)中的释放量. 降解释药考察结果验证了 FCDC@Cu-MSN@DA 具备显著的 pH 响应药物控释行为.

2.3 化学动力学性能

本研究采用电子自旋共振(ESR)的方法, 以 DMPO 为自由基捕获剂, 考察 Cu-MSN 和 FCDC@Cu-MSN@DA 催化产生 $\cdot\text{OH}$ 的能力. 如图 4(A)所示, ESR 波谱记录到 1:2:2:1 典型的羟基自由基特征峰, 表明溶液中发生了类芬顿反应. 随着催化反应时间的延长, $\cdot\text{OH}$ 峰强增加, 表

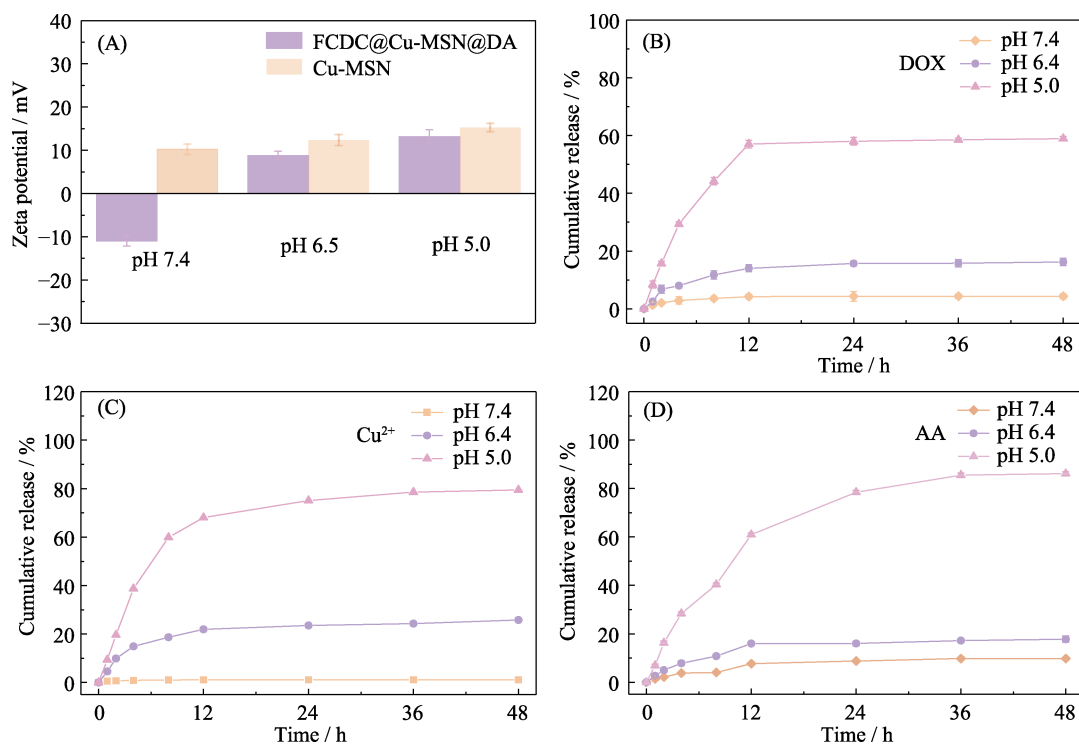


图 3 FCDC@Cu-MSN@DA 的 pH 响应特性表征

Fig. 3 pH response of FCDC@Cu-MSN@DA

(A) Zeta potential of Cu-MSN and FCDC@Cu-MSN@DA in pH 7.4, 6.5 and 5.0 solutions; (B-D) DOX (B), Cu^{2+} (C) and AA (D) released from FCDC@Cu-MSN@DA in different pH buffer solutions

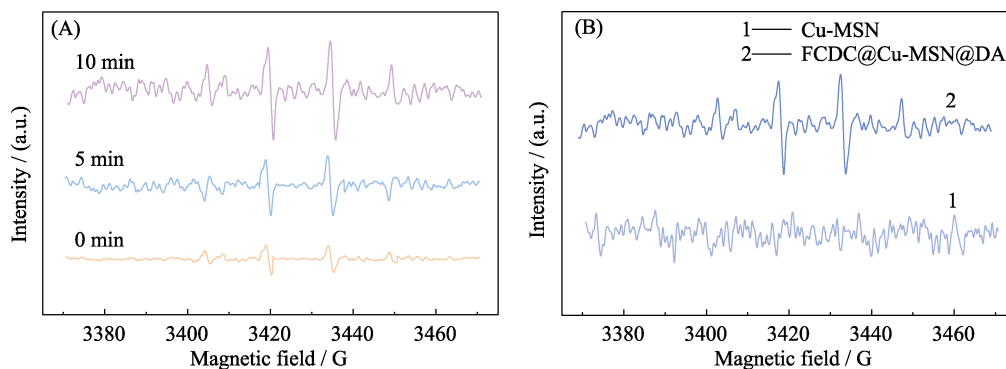


图 4 不同催化反应时间的 FCDC@Cu-MSN@DA 的电子自旋共振能谱(A), Cu-MSN 和 FCDC@Cu-MSN@DA 的电子自旋共振能谱(B)

Fig. 4 ESR signals of FCDC@Cu-MSN@DA for different time (A), ESR spectra of Cu-MSN and FCDC@Cu-MSN@DA (B)

明·OH 的产生具有时间依赖性。然而, Cu-MSN 的 ESR 波谱中未出现·OH 特征峰(图 4 (B))。这是因为单独的 Cu-MSN 溶液缺少 H_2O_2 无法产生·OH, 而 FCDC@Cu-MSN@DA 中 AA 能够提供外源性 H_2O_2 , 促进类芬顿反应, 产生·OH 自由基。

FCDC@Cu-MSN@DA 负载 AA 可以提供外源性 H_2O_2 , 提高 CDT 产生高细胞毒性的·OH 含量。肿瘤细胞内 AA 的主要形式是抗坏血酸单阴离子 ($AscH^-$), 可经历两个连续的单电子氧化过程生成抗坏血酸自由基($Asc^{\cdot-}$)中间产物和双电子氧化产物脱氢抗坏血酸(DHA)^[25-26]。 $Asc^{\cdot-}$ 经系列反应最终生成 ROS, 尤其是 H_2O_2 , 从而呈现促氧化剂特征。

本研究采用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)法测定了 FCDC@Cu-MSN@DA 的催化活性。TMB 可以被·OH 氧化, 生成蓝绿色反应物, 在紫外光谱 370 nm 处存在特征峰^[27]。从图 5(A)中可以看出, FCDC@Cu-MSN@DA 在中性和碱性条件下与 TMB 反应, 均无颜色变化。而在酸性(pH 5.0)条件下, TMB 溶液颜色变化显著, 表明 AA 经历自氧化而产生了 H_2O_2 , 进而通过诱导 Cu^{2+} 发生类芬顿反应产生·OH。如图 5(B)所示, (1) Cu-MSN 添加 50 mmol/L 的 H_2O_2 和(2) FCDC@Cu-MSN@DA 在酸性缓冲液(pH 5.0)中, 与 TMB 反应后溶液颜色均发生变化, 并在 370 nm 处有明显的紫外特征吸收峰。这是因为纳米催化剂在酸性溶液中会断裂 Cu-O-Si 键释放出 Cu^{2+} 和 AA^[28], 从而由 Cu^{2+} 引发类芬顿反应生成·OH 氧化 TMB, 同时 AA 通过自氧化产生更多 H_2O_2 , 进一步诱导类芬顿反应。实验组(3)、(4)和(5)在 370 nm 处并未出现吸收峰, 证明 AA 和 H_2O_2 单独存在时不具备生成强氧化性·OH 的能力。

2.4 细胞摄取

采用激光共聚焦显微镜观察 A549 细胞、MCF-7 细胞和 4T1 细胞对 FCDC@Cu-MSN@DA

的特异性摄取行为。三种细胞与 Cu-MSN@DA 共培养 5 h 后, 细胞内的红色荧光强度较弱, 并且红色荧光强度无明显差异(图 6)。叶酸靶向修饰后, FCDC@Cu-MSN@DA 在叶酸受体高表达的 MCF-7 和 4T1 细胞中的荧光强度明显高于叶酸受体表达较弱的 A549 细胞的荧光强度^[29-30], 表明 FCDC@Cu-MSN@DA 能通过识别高表达细胞特异性来提高纳米颗粒的摄取, 进而增强 CDT 与化疗协同治疗的效果。

2.5 细胞内 ROS 生成

DCFH-DA 是一种具有细胞膜渗透性的氧化应激指示剂^[31], 当它进入细胞后, 可被细胞酯酶水解转化为非荧光 DCFH, 随后被氧化产生强荧光产物 2',7'-二氯荧光素(DCF), 该荧光产物可被荧光显微镜观察到。使用 DCFH-DA 作为探针研究癌细胞内 ROS 的生成能力。结果显示(图 7), 与其他组相比, 4T1 细胞与 FCDC@Cu-MSN@DA 共培养后显示最亮的绿色荧光, 表明 FCDC@Cu-MSN@DA 消耗胞内 GSH 生成·OH 的能力最强。

2.6 细胞毒性及化疗-化学动力学联合治疗

通过 MTT 考察 4T1 细胞和正常血管内皮细胞(EC)对 Cu-MSN 和 FCDC@Cu-MSN 两种材料的细胞毒性(图 8(A, B))。结果显示 EC 细胞存活率较高, 说明两种材料对细胞几乎无细胞毒性。这是由于 Cu-MSN 和 FCDC@Cu-MSN 在 EC 细胞中结构稳定, 不会分解释放 Cu^{2+} 。这两种材料与 4T1 细胞共培养 24 h 后, 也未出现明显毒性。因为这两种材料对肿瘤细胞的毒性仅依赖于单一 CDT 治疗, 即 Cu^{2+} 与胞内过量的 H_2O_2 反应产生的强细胞毒性·OH, 但由于胞内 H_2O_2 含量有限而难以产生足量的·OH, 同时胞内还原型 GSH 还会不断消耗·OH, 从而表现出较低的肿瘤细胞杀伤力。

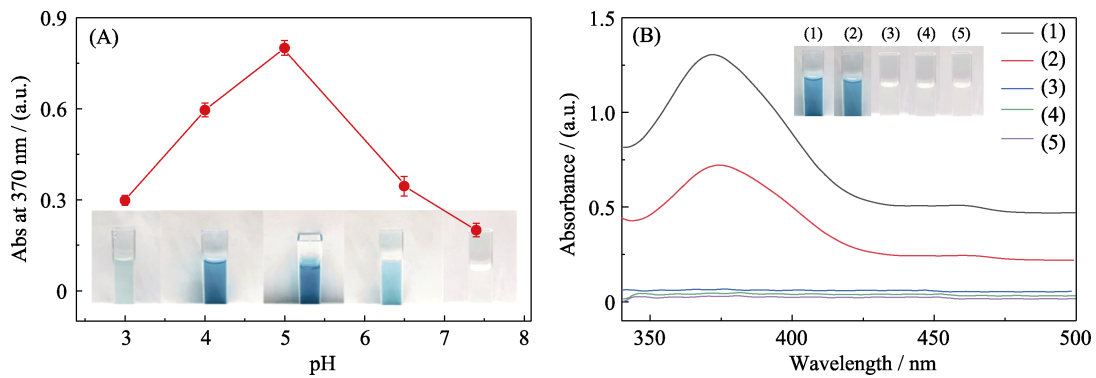


图 5 FCDC@Cu-MSN@DA 化学动力学性能

Fig. 5 Chemodynamic property of FCDC@Cu-MSN@DA

(A) Absorbance of oxidized TMB after treatment with FCDC@Cu-MSN@DA (1 mg/mL) and H₂O₂ (100 μmol/L) in different pH solutions (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.5, and 7.4); (B) UV-Vis absorption spectra of TMB (oxTMB) catalyzed by (1) TMB+Cu-MSN+H₂O₂, (2) TMB+FCDC@Cu-MSN@DA, (3) TMB+AA, (4) TMB+H₂O₂, and (5) TMB in ABS solution (pH 5.0)
 Insets in (A) and (B) show the corresponding color changes under each pH; TMB: 3,3,5,5-Tetramethylbenzidine;
 ABS: Acetate buffer solution; Colorful figures are available on website

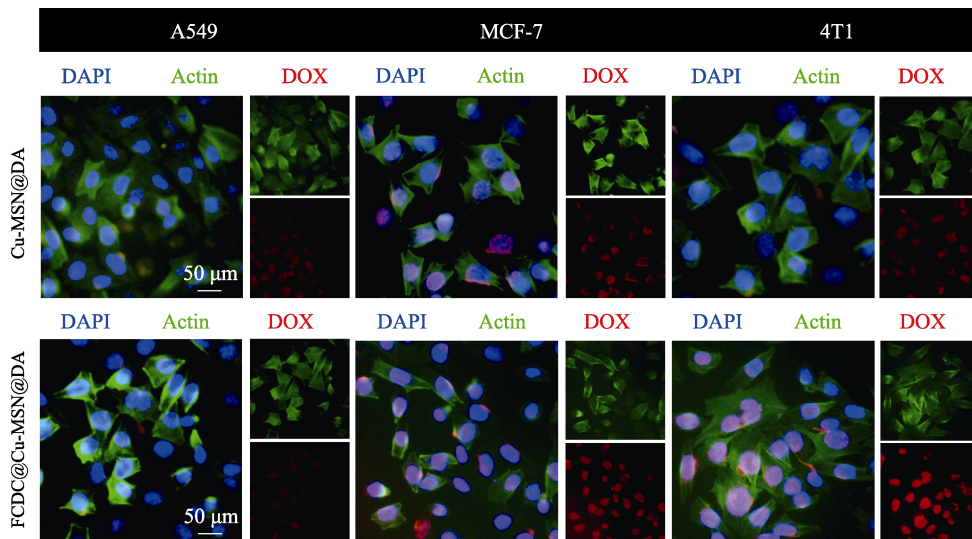


图 6 A549、MCF-7 和 4T1 三种癌细胞吞噬 Cu-MSN@DA 和 FCDC@Cu-MSN@DA 的激光共聚焦显微照片

Fig. 6 Laser scanning confocal microscopic images of A549, MCF-7 and 4T1 cancer cells incubated with Cu-MSN@DA and FCDC@Cu-MSN@DA for 5 h

DAPI: a staining to show cell nuclei; Actin: a staining to show cell plasm, especially the protein actin;
 DOX: a staining to show doxorubicin, an anticancer medicine

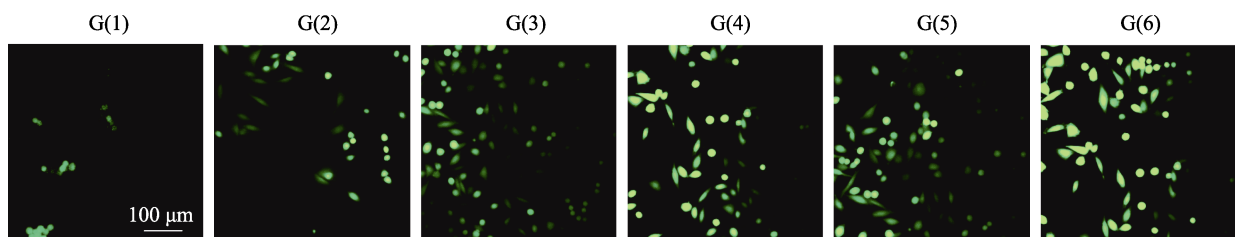


图 7 不同样品处理 4T1 细胞后产生 ROS 的荧光照片

Fig. 7 Fluorescence images of generation of radical oxygen species (ROS) by 4T1 cells incubated with different samples G(1): PBS; G(2): DOX; G(3): FCDC@Cu-MSN@D; G(4): FCDC@Cu-MSN@A; G(5): CDC@Cu-MSN@DA; G(6): FCDC@Cu-MSN@DA

图8(C)为不同样品处理4T1细胞后的细胞存活率,可以看出,裸药组DOX、化疗组FCDC@Cu-MSN@D、CDT组FCDC@Cu-MSN@A、非靶向协同治疗组CDC@Cu-MSN@DA和靶向协同治疗组FCDC@

Cu-MSN@DA的细胞毒性存在明显的浓度依赖性,随着浓度升高,细胞存活率逐渐降低。在相同浓度下,靶向协同治疗组FCDC@Cu-MSN@DA对肿瘤细胞杀伤力最强,这是由于FA主动靶向提高了细胞对纳

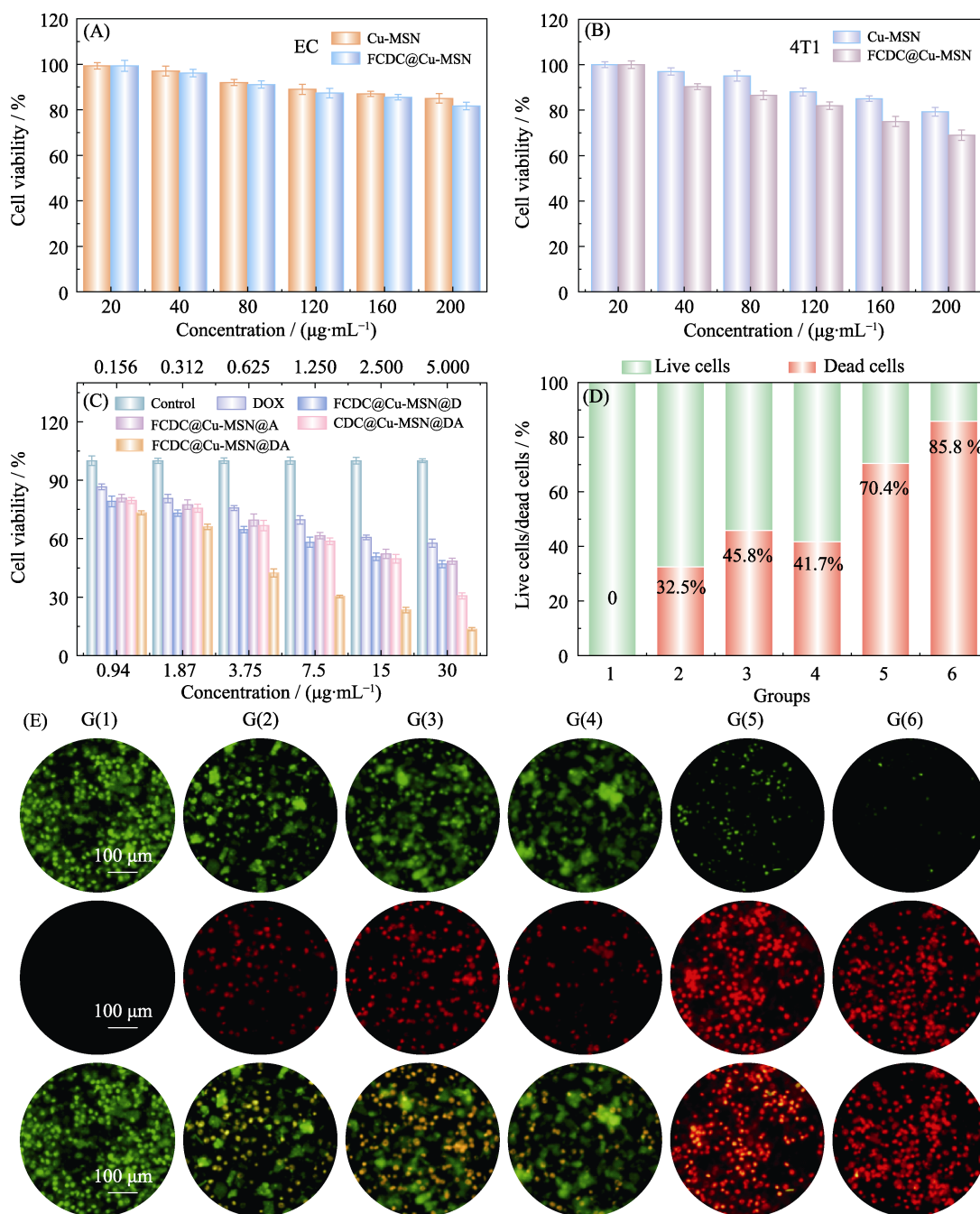


图 8 FCDC@Cu-MSN@DA 对 4T1 细胞的化疗-化学动力学协同治疗效果

Fig. 8 Effect of chemo-chemodynamic therapy on 4T1 cells by FCDC@Cu-MSN@DA

(A, B) Cell viability of normal cells (endothelial cell, EC) (A) and cancer cells (4T1 cells) (B) after incubation with different concentrations of Cu-MSN and FCFC@Cu-MSN@DA for 24 h; (C) Cell viability of 4T1 cells incubated with various formulations for 24 h; (D) Semi-quantitative analysis of live/dead cells; (E) Live/dead cell staining images of 4T1 cells after different treatments: G(1): Phosphate buffered saline (PBS); G(2): DOX; G(3): FCDC@Cu-MSN@D; G(4): FCDC@Cu-MSN@A; G(5): CDC@Cu-MSN@DA; G(6): FCDC@Cu-MSN@DA; Colorful figures are available on website

米颗粒的摄取能力, 使其释放出更多的 Cu^{2+} 与生成的 H_2O_2 反应产生 $\cdot\text{OH}$, 增强了 CDT 疗效, 与此同时结合化疗则展现出更强的抗肿瘤活性。

活死细胞染色及半定量结果中(图 8(D, E)), 与单一治疗组相比, 非靶向协同治疗组 CDC@Cu-MSN@DA 和靶向 FCDC@Cu-MSN@DA 均呈现出更强的红色荧光, 说明 CDT 和化疗联合治

疗优于单一治疗; 同时, 非靶向协同治疗组 CDC@Cu-MSN@DA 的细胞死亡率为 70.4%, 而靶向治疗组 FCDC@Cu-MSN@DA 的死亡细胞占比 85.8%, 说明靶向协同治疗组 FCDC@Cu-MSN@DA 诱导的细胞凋亡率高于非靶向协同治疗组 CDC@Cu-MSN@DA, 提示靶向基团叶酸可以增强纳米粒子进入肿瘤细胞, 从而诱发催化反应, 杀死肿瘤细胞。

3 结论

本研究制备了一种 pH 响应兼电荷可逆转的靶向纳米催化剂 FCDC@Cu-MSN@DA, 其中, Cu²⁺掺杂介孔二氧化硅作为药物载体, 具有类芬顿反应催化活性和较高的药物负载能力, 表面经多功能聚合物链段修饰后, 该纳米催化剂可用于增强化疗和化学动力学联合治疗。在模拟的肿瘤弱酸性微环境下, FCDC@Cu-MSN@DA 可以提供 H₂O₂ 并催化其生成具有强细胞毒性的·OH, 增强化学动力学治疗的效果。同时通过体外实验证明了化疗与化学动力学治疗的协同作用可更有效地杀伤肿瘤细胞。综上, 本研究合成的多功能靶向纳米催化剂, 为新型纳米催化剂应用于癌症治疗提供了有价值的参考。

参考文献:

- [1] LI Z L, WU H, ZHU J Q, *et al.* Novel strategy for optimized nanocatalytic tumor therapy: from an updated view. *Small Science*, 2022, **2(7)**: 2200024.
- [2] YANG B W, CHEN Y, SHI J L. Nanocatalytic medicine. *Advanced Materials*, 2019, **31(39)**: e1901778.
- [3] WU A, ZHU M, ZHU Y. Copper-incorporated calcium silicate nanorods composite hydrogels for tumor therapy and skin wound healing. *Journal of Inorganic Materials*, 2022, **37(11)**: 1203.
- [4] ZHU L P, DAI Y L, GAO L Z, *et al.* Tumor microenvironment-modulated nanozymes for NIR-II-triggered hyperthermia-enhanced photo-nanocatalytic therapy via disrupting ROS homeostasis. *International Journal of Nanomedicine*, 2021, **16**: 4559.
- [5] TANG Z M, ZHAO P R, WANG H, *et al.* Biomedicine meets Fenton chemistry. *Chemical Reviews*, 2021, **121**: 1981.
- [6] BIAN Y L, LIU B, LIANG S, *et al.* Cu-based MOFs decorated dendritic mesoporous silica as tumor microenvironment responsive nanoreactor for enhanced tumor multimodal therapy. *Chemical Engineering Journal*, 2022, **435(2)**: 135046.
- [7] ZHANG W J, ZHAO X Y, LÜ J W, *et al.* Progresses on hollow periodic mesoporous organosilicas: preparation and application in tumor therapy. *Journal of Inorganic Materials*, 2022, **37(11)**: 1192.
- [8] LIU Y, WANG Y H, SONG S Y, *et al.* Cancer therapeutic strategies based on metal ions. *Chemical Science*, 2021, **12(37)**: 12234.
- [9] SUN Q Q, WANG Z, LIU B, *et al.* Recent advances on endogenous/exogenous stimuli-triggered nanoplatforams for enhanced chemodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, **451**: 214267.
- [10] WANG Z, LIU B, SUN Q Q, *et al.* Fusiform-like copper(II) based metal-organic framework through relief hypoxia and GSH-depletion co-enhanced starvation and chemodynamic synergetic cancer therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, **12(15)**: 17254.
- [11] SHENOY N, CREAGAN E, WITZIG T, *et al.* Ascorbic acid in cancer treatment: let the phoenix fly. *Cancer Cell*, 2018, **34(5)**: 700.
- [12] DOSKEY C M, BURANASUDJA V, WAGNER B A, *et al.* Tumor cells have decreased ability to metabolize H₂O₂: implications for pharmacological ascorbate in cancer therapy. *Redox Biology*, 2016, **10**: 274.
- [13] YANG B W, SHI J L. Ascorbate tumor chemotherapy by an iron-engineered nanomedicine catalyzed tumor-specific pro-oxidation. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, **142(52)**: 21775.
- [14] AI Y J, SUN H, GAO Z X, *et al.* Dual enzyme mimics based on metal-ligand cross-linking strategy for accelerating ascorbate oxidation and enhancing tumor therapy. *Advanced Functional Materials*, 2021, **31(40)**: 2103581.
- [15] WU M Q, DING Y M, LI L L. Recent progress in the augmentation of reactive species with nanoplatforams for cancer therapy. *Nanoscale*, 2019, **11**: 19658.
- [16] FANG C, DENG Z, CAO G, *et al.* Co-ferrocene MOF/glucose oxidase as cascade nanozyme for effective tumor therapy. *Advanced Functional Materials*, 2020, **30**: 1910058.
- [17] ZHANG C Y, YAN L, WANG X, *et al.* Tumor microenvironment-responsive Cu₂(OH)PO₄ nanocrystals for selective and controllable radiosensitization via the X-ray-triggered Fenton-like reaction. *Nano Letters*, 2019, **19(3)**: 1749.
- [18] DONG S M, DONG Y S, JIA T, *et al.* GSH depleted nanozymes with hyperthermia-enhanced dual enzyme-mimic activities for tumor nanocatalytic therapy. *Advanced Materials*, 2020, **32(42)**: e2002439.
- [19] CHEN T, ZENG W W, LIU Y Q, *et al.* Cu-doped polypyrrole with multi-catalytic activities for sono-enhanced nanocatalytic tumor therapy. *Small*, 2022, **18(29)**: 2270152.
- [20] NIU J X, SUN S, LIU P F, *et al.* Copper-based nanozymes: properties and applications in biomedicine. *Journal of Inorganic Materials*, 2023, **38(5)**: 489.
- [21] XU W J, WANG Y P, HOU G H, *et al.* Tumor microenvironment responsive hollow nanoplatforam for triple amplification of oxidative stress to enhance cuproptosis-based synergistic cancer therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 2023, doi.org/10.1002/adhm.202202949.
- [22] XU W J, QIAN J M, HOU G H, *et al.* A hollow amorphous bimetal organic framework for synergistic cuproptosis/ferroptosis/apoptosis anticancer therapy via disrupting intracellular redox homeostasis and copper/iron metabolisms. *Advanced Functional Materials*, 2022, **32(40)**: 2205013.
- [23] SHAO L J, HU T S, FAN X Y, *et al.* Intelligent nanoplatforam with multitherapeutic modalities for synergistic cancer therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, **14(11)**: 13122.
- [24] MIAO Y L, QIU Y D, YANG W J, *et al.* Charge reversible and bio-degradable nanocarriers showing dual pH-/reduction-sensitive disintegration for rapid site-specific drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, **169**: 313.
- [25] TESTA U, PELOSI E, CASTELLI G. New promising developments for potential therapeutic applications of high-dose ascorbate as an anticancer drug. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 2021, **14(3)**: 179.
- [26] LEVINE M, VIOLET P C. Data Triumph at C. *Cancer cell*, 2017, **31(4)**: 467.
- [27] WANG Y W, CHEN J J, TIAN Z F, *et al.* Potassium ferrate-loaded porphyrin-based (VI) metal-organic frameworks for combined photodynamic and chemodynamic tumor therapy. *Journal of Inorganic Materials*, 2021, **36(12)**: 1305.
- [28] WU W C, YU L D, JIANG Q Z, *et al.* Enhanced tumor-specific disulfiram chemotherapy by *in situ* Cu²⁺ chelation-initiated nontoxicity-to-toxicity transition. *Journal of The American Chemical Society*, 2019, **141(29)**: 11531.
- [29] CHENG L C, MA H, SHAO M K, *et al.* Synthesis of folate-chitosan nanoparticles loaded with ligustrazine to target folate receptor positive cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 2017, **16(2)**: 1101.
- [30] HONG J Y, SUN Z H, LI Y J, *et al.* Folate-modified annonaceous acetogenins nanosuspensions and their improved antitumor efficacy. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, **12(1)**: 5053.
- [31] ZHANG L Z, YANG A J, RUAN C P, *et al.* Copper-nitrogen-coordinated carbon dots: transformable phototheranostics from precise PTT/PDT to post-treatment imaging-guided PDT for residual tumor cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, **15(2)**: 325.