

## 介孔有机硅为载体的纳米递送系统制备及其体外化疗-光热联合治疗性能研究

曾雨淋<sup>1,2</sup>, 陈佳杰<sup>1,3</sup>, 田正芳<sup>2</sup>, 朱敏<sup>1</sup>, 朱钰方<sup>2,3</sup>

(1. 上海理工大学 材料科学与工程学院, 上海 200093; 2. 黄冈师范学院 化学化工学院, 催化材料制备及应用湖北省重点实验室, 黄冈 438000; 3. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 上海 200050)

**摘 要:** 有机/无机杂化的介孔有机硅纳米颗粒因其高的比表面积、丰富的介孔孔道、功能性的骨架以及高的药物装载量等特点而在生物医学领域受到广泛关注。本研究提出以二硫键桥接的有机/无机杂化介孔有机硅纳米颗粒为载体共装载化疗药物和光热剂, 设计制备以 DNA 分子作为控释“开关”修饰介孔有机硅纳米颗粒的纳米递送系统(ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub>)。该纳米递送系统结合了光热剂的光热效应以及 DNA 分子随温度升高而从颗粒表面脱附的特性, 可实现近红外光照射激发药物在肿瘤细胞中的控制释放, 同时获得药物化疗-光热联合治疗肿瘤的效果。实验结果表明, 纳米递送系统在近红外光照下能迅速升温至 43 ℃ 以上的热疗温度, 而且在 37 ℃ 条件下 6 h 内缓慢释放药物 12.3%, 而当温度升至 43 ℃ 时则快速释放药物 52.4%; 细胞实验显示该纳米递送系统能够被 HeLa 肿瘤细胞吞噬, 在近红外光照下有明显的药物化疗-光热联合治疗效果。因此, ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送系统在药物化疗-光热联合治疗肿瘤方面具有应用前景。

**关 键 词:** 介孔有机硅; 纳米载体; 控制释放; 联合治疗

中图分类号: TQ174 文献标识码: A

## Preparation of Mesoporous Organosilica-based Nanosystem for *in vitro* Synergistic Chemo- and Photothermal Therapy

ZENG Yulin<sup>1,2</sup>, CHEN Jiajie<sup>1,3</sup>, TIAN Zhengfang<sup>2</sup>, ZHU Min<sup>1</sup>, ZHU Yufang<sup>2,3</sup>

(1. School of Materials Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. Hubei Key Laboratory of Processing and Application of Catalytic Materials, College of Chemical Engineering, Huanggang Normal University, Huanggang 438000, China; 3. Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

**Abstract:** Organic-inorganic hybrid mesoporous organosilica has gained more attention in biomedicine due to its high surface area, mesoporous channels, functional framework, and high drug loading capacity. In this study, disulfide-bridged hybrid mesoporous organosilica nanoparticles (MONs) as nanocarriers were employed to construct a nanosystem (ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub>) for delivering drugs and photothermal agents, in which DNA molecules as “switches” were modified on the surface of MONs to control drug release. The results showed that the ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> nanosystem could increase the temperature to above 43 ℃ for photothermal therapy with

收稿日期: 2020-02-24; 收到修改稿日期: 2020-03-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(51572172); 上海理工大学科技发展项目(2018KJFZ016, 2019KJFZ023)

National Natural Science Foundation of China (51572172); University of Shanghai for Science and Technology (2018KJFZ016, 2019KJFZ023)

作者简介: 曾雨淋(1995-), 女, 硕士研究生. E-mail: 1591422585@qq.com

ZENG Yulin (1995-), female, Master candidate. E-mail: 1591422585@qq.com

通讯作者: 朱敏, 副教授. E-mail: mzhu@usst.edu.cn; 朱钰方, 教授. E-mail: zjf2412@163.com

ZHU Min, associate professor. E-mail: mzhu@usst.edu.cn; ZHU Yufang, professor. E-mail: zjf2412@163.com

near-infrared (NIR) laser irradiation. On the other hand, the ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> nanosystem exhibited a very slow release of DOX (12.3% in 6 h) at 37 °C, but a rapid release of DOX (52.4% in 6 h) occurred at 43 °C. Cell culture experiments indicated that the nanosystem can be internalized by HeLa cells, and exhibited an enhanced therapeutic efficacy of synergistic chemo- and photothermal therapy. Hence, the ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> nanosystem might be promising for synergistic chemo- and photo-thermal tumor therapy.

**Key words:** mesoporous organosilica; nanocarriers; controlled release; synergistic therapy

恶性肿瘤已成为当今世界威胁人类健康的主要疾病之一。药物化疗是临床上肿瘤治疗的主要方法,但是高毒性的化疗药物往往对机体造成严重的毒副作用,且肿瘤细胞容易产生耐药性而降低治疗效果<sup>[1-4]</sup>。因此,除药物化疗外,人们不断探寻新型的肿瘤治疗方式,以提高肿瘤临床治疗效果。其中,光热治疗通过近红外光辐照在肿瘤部位聚集的光热剂而产生热量,使得局部温度快速上升而导致肿瘤细胞消融,具有外源性控制、无创、低副作用等优势<sup>[5]</sup>,是实现肿瘤精准治疗的有效策略之一。源于肿瘤的复杂性和多样性以及以提高肿瘤治疗效果为目的,目前肿瘤治疗研究已经从单一疗法逐步向联合疗法发展<sup>[6-13]</sup>。已经有研究表明,药物化疗与光热治疗的联合治疗模式,不仅可以发挥各自治疗方式的治疗效果,而且光热治疗引起的局部温度升高可以提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性而增强药物化疗的治疗效果。因此,药物化疗与光热治疗的联合治疗模式显示出显著的超加性(即“1+1>2”)效应<sup>[14]</sup>,其协同治疗效果明显高于单一疗法。

研究表明,纳米材料能够通过肿瘤的高通透性和滞留效应(Enhanced permeability and retention effect, EPR)在肿瘤部位富集。基于纳米颗粒载体的肿瘤治疗方式,将化疗药物和光热剂通过有效手段装载于纳米颗粒载体,能够防止药物和光热剂在血液循环或健康组织中的提前释放,成为改善治疗效果和降低毒副作用的途径之一<sup>[3,15]</sup>。近几十年来,有机胶束、脂质体、生物降解高分子、水凝胶、无机纳米粒子等各种纳米材料作为载体递送药物等诊疗剂,其中有机纳米载体化学性质不稳定,容易造成药物等诊疗剂的崩解释放,无机纳米颗粒则面临生物降解性差等问题<sup>[16-18]</sup>。已有研究表明,有机/无机杂化纳米颗粒兼具有机纳米材料和无机纳米颗粒的优点,能有效改善溶血<sup>[19]</sup>,增强生物降解性<sup>[20-21]</sup>以及降低细胞毒性等,因此在纳米递送系统领域具有良好的应用前景<sup>[22]</sup>。已有研究将有机/无机杂化的介孔有机硅纳米颗粒用于药物递送、成像引导的药物化疗等<sup>[6,23]</sup>,但以介孔有机硅纳米颗粒构建纳米递送系统用于药物化疗-光热联合治疗肿瘤的研究还未见报道。

本研究提出以二硫键桥接的有机/无机杂化介孔有机硅纳米颗粒(Mesoporous organosilica nanoparticles, MONs)为载体共装载化疗药物(阿霉素 DOX)和光热剂(吲哚菁绿 ICG),设计以 DNA 分子作为控释“开关”修饰介孔有机硅纳米颗粒的纳米递送系统。该纳米递送系统结合了 ICG 的光热效应以及 DNA 分子随温度升高而从 MONs 表面脱附的特性来激发 DOX 和 ICG 在肿瘤细胞中的控制释放,同时获得药物化疗-光热联合治疗肿瘤的效果。

## 1 实验方法

### 1.1 药品及试剂

正硅酸四乙酯(TEOS, AR)、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC, AR)、三乙醇胺(TEA, AR)、双-[ $\gamma$ -(三乙氧基硅)丙基]-二硫化物(BTDS)、无水甲醇(AR)、无水乙醇( $\geq 99.7\%$ )、无水甲苯(AR)、3-氨基三乙氧基硅烷(APTES, 98%)、浓盐酸(HCl, 36%~38%)、盐酸阿霉素(DOX, 98%)、吲哚菁绿(ICG)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、吗啉乙磺酸(MES)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)均购于国药集团化学试剂有限公司。DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、青链霉素混合液、谷胱甘肽(GSH,  $\geq 95\%$ )和胰酶购买于上海润成生物有限公司。Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒)购自上海碧云天生物技术有限公司。磷酸盐药片、DNA 购自生工生物工程(上海)有限公司, DNA 序列为 5'-COOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-ACT CCT GGT ATG TAG CGC TA。

### 1.2 介孔有机硅纳米颗粒的合成及氨基修饰

二硫键桥接的 MONs 制备参照文献报道的方法<sup>[21,25]</sup>: 2 g CTAC 和 1 mL TEA 的水溶液(10wt%)加入 20 mL 去离子水,置于 80 °C 油浴中加热搅拌至其完全溶解;接着滴加 1 mL TEOS 和 0.2 mL BTDS 的均匀混合液,继续反应 4 h 后将白色沉淀进行高速离心和乙醇洗涤数次,得到含有结构导向剂的 MONs。结构导向剂去除采用盐酸乙醇溶液萃取法,即将含有结构导向剂的 MONs 超声分散于 300 mL 盐酸乙醇溶液( $V_{\text{HCl}}:V_{\text{EtOH}}=1:10$ )中,于 80 °C 条件下

油浴回流 12 h, 离心分离并收集沉淀, 此萃取过程重复 3 次后用乙醇洗涤颗粒, 于 80 °C 真空干燥后得到 MONs。MONs 的氨基修饰过程如下: 将 100 mg MONs 超声分散于 40 mL 无水甲苯中, 并在 100 °C 油浴中处理 2 h 以除尽体系中的水分; 然后向上述悬浮液中加入 1.5 mL APTES, 在 100 °C 条件下回流 20 h 后高速离心分离, 最后将离心产物用甲苯和乙醇洗涤 3 次后于 60 °C 下真空干燥, 即得到氨基修饰的 MONs (MONs-NH<sub>2</sub>)。

### 1.3 药物/光热剂装载及封装

本研究以 MONs-NH<sub>2</sub> 为载体, 选用 DOX 为模型药物、ICG 为光热剂、羧基修饰的链长为 20 碱基的 DNA(DNA<sub>20</sub>)为控释“开关”构建纳米递送系统。将 ICG 和 DOX 分别配制成 0.5 和 1 mg/mL 的甲醇溶液, 各取 10 mL 溶液混合后加入 20 mg MONs-NH<sub>2</sub>, 然后于室温条件下避光搅拌 24 h。最后离心分离—甲醇洗涤—离心分离后得到 ICG 和 DOX 共装载的 MONs(ICG/DOX-MONs)。

DNA<sub>20</sub> 封装过程如下<sup>[25-26]</sup>: 将 DNA<sub>20</sub> 配制成浓度为 100 μmol/L 的水溶液, 并于 -20 °C 保存备用。取 50 μL DNA<sub>20</sub> 溶液, 加入 50 μL EDC 溶液(20 mg/mL)振荡 2 min 后, 再加入 30 μL NHS 溶液(20 mg/mL), 继续振荡 20 min 以活化 DNA<sub>20</sub> 的 5'端羧基; 然后, 将活化的 DNA<sub>20</sub> 溶液加入到 2 mL ICG/DOX-MONs 的 MES(10 mmol/L, pH 6.0)悬浮液中, 室温避光摇晃 24 h 后得到 DNA<sub>20</sub> 封装的 ICG/DOX-MONs (ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub>)。最后, 离心分离并用 PBS 缓冲液洗涤三次后分散于 PBS 缓冲液中备用。

### 1.4 结构与理化性能表征

采用 Tecnai G2 F30 型场发射电子透射显微镜和 FEI Quanta 450 型场发射电子显微镜观察颗粒的形貌和微观结构。采用 Tristar 3020 型比表面积和孔径分析仪测定样品的比表面积和孔径分布。采用 Nanodrop 2000C 型超微量紫外-可见分光光度计测定药物/光热剂的装载与释放。采用 808 nm 近红外激光发生器和 FLIR AX5 series 型红外成像仪测定样品的光热性能。红外图谱采用 KBr 压片法, 在 LAM750 型红外光谱仪上测定。采用 Epoch 型酶标仪测定细胞存活率。采用 Olympus IX73P1F 型倒置荧光显微镜观察细胞吞噬情况。采用马尔文 Nano-ZS90 纳米粒径和电位分析仪测定动态光散射(DLS)颗粒粒径分布和颗粒表面 Zeta 电位。

### 1.5 光热性能测试

分别配制浓度为 0、20、50、100、200、300 μg/mL 的颗粒悬浮液, 取 1 mL 置于 48 孔板中。用 808 nm 光源进行照射, 功率密度为 0.75 W/cm<sup>2</sup>, 光照时间

为 6 min, 使用热成像记录仪记录样品温度, 绘制样品温度随时间的变化曲线。另一方面, 对 100 μg/mL 颗粒悬浮液改变功率密度 0.5、0.75、1、2 W/cm<sup>2</sup>, 光照 6 min, 记录样品的升温曲线。

### 1.6 药物/光热剂释放性能研究

不同温度下的药物释放: 将 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 颗粒分散于 PBS 溶液中得到 1 mg/mL 的颗粒悬浮液, 取 5 mL 分别在 37 和 43 °C 的水浴中振荡, 每隔 1 h 取出 15 μL 液体同时补充 15 μL 新鲜缓冲液。使用 Nanodrop 2000C 测定其在 480 nm (DOX)和 780 nm (ICG)处的吸光度, 各测试 3 次, 绘制药物释放率随时间变化的曲线。另外, 采用相同的方法还测定了在 37 和 43 °C 的交替温度情况下的 DOX 和 ICG 释放率。

### 1.7 体外细胞毒性评估

本研究以小鼠的子宫癌细胞(HeLa)为细胞模型, 培养基为 DMEM, 培养基中加入 10%(V/V)胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素; 细胞培养在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 气氛的 CO<sub>2</sub> 培养箱中。采用标准的 CCK-8 方法分析 MONs 的体外细胞毒性。将细胞均匀地播种在 96 孔板中, 细胞密度为 4000 个/孔, 培养 24 h 待细胞贴壁后去除培养基, 然后每孔加入 100 μL MONs 的 DMEM 溶液(浓度分别为 0、12.5、25、50、100、200 μg/mL); 孵育 24 h 后, 吸取上层液体, 每孔加入 100 μL PBS 洗涤, 除去死细胞、细胞代谢物以及加入的颗粒; 接着每孔加入 100 μL CCK-8 溶液, 共孵育 3 h 后, 吸取上层液体用于酶标仪测定其 450 nm 处的吸光度。另一方面, 细胞与 MONs 共培养 24 h 后用 PBS 洗涤, 除去死细胞、细胞代谢物以及加入的颗粒后, 每孔再加入 100 μL 新鲜 DMEM 培养液继续培养 24 h, 然后每孔加入 100 μL CCK-8 溶液, 共孵育 3 h 后, 吸取上层液体用于酶标仪测定其 450 nm 处的吸光度。将 MONs 溶液共培养组的活细胞数与空白对照组的活细胞数之间的比值作为细胞毒性分析的依据。

### 1.8 细胞吞噬

将 HeLa 细胞均匀播种在 24 孔板中, 细胞密度为 5000 个/孔, 待细胞贴壁后, 吸取培养基, 然后每孔加入 500 μL 的颗粒 DMEM 溶液(50 μg/mL), 空白组(不加颗粒)加入等体积的培养液; 与细胞共培养 3 h 后, 吸取上层液体, 接着用 PBS 洗涤 2 次以去除未被吞噬的颗粒; 每孔加入 500 μL 的多聚甲醛溶液(wt%)固定细胞 15 min, 用 DAPI 将细胞核染色 5 min; 最后, 细胞用 PBS 洗涤 3 次后用倒置荧光显微镜观察颗粒在细胞内的分布情况。

## 1.9 联合治疗

采用 ICG/DOX-MONs 颗粒为比较组研究 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 的化疗-光热联合治疗效果: 配制浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的 ICG/DOX-MONs 和 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 的 DMEM 溶液待用。将 HeLa 细胞均匀播种于 96 孔板中, 细胞密度为 8000 个/孔, 待细胞贴壁后吸取培养液, 加入 100  $\mu\text{L}$  颗粒悬浮液, 每种材料各加 15 个孔, 设为不光照、一次光照、两次光照三个组, 每组 5 个平行样, 空白组作为对照; 培养 5 h 后使用近红外光照射, 功率密度为 2  $\text{W/cm}^2$ , 照射时间为 3 min/孔; 照射后的细胞继续培养 3 h 后, 两次光照组重复上述光照操作, 光照后继续培养 3 h。然后采用与上述颗粒细胞毒性测试相同的 CCK-8 方法测定细胞活性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MONs 的微观形貌及结构

MONs 颗粒的形貌如图 1(a, b)所示。MONs 颗粒为球形, 颗粒尺寸均匀, 粒径约 45 nm; DLS 测试颗粒粒径尺寸比 SEM 和 TEM 观察粒径略大(图 1(c)), 这是因为 DLS 测试得到的是颗粒的水合粒径, 同时也与部分颗粒轻微团聚有关。放大的 TEM 照片中能清晰看到均匀的介孔孔道分布。图 1(d)的  $\text{N}_2$  吸附脱附等温线及相应的孔径分布图也表明 MONs 具有介孔结构, 其比表面积为 444.5  $\text{m}^2/\text{g}$ , 平均孔径约为 4.5 nm。因此, MONs 可作为纳米载体装载药物、光热剂等客体分子。

### 2.2 纳米递送系统制备及其理化性能

本研究的 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送系统制备包括 MONs 表面氨基修饰、ICG/DOX 装载和 DNA<sub>20</sub> 包封。图 2(a, b)为 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送系统制备过程各阶段颗粒表面 Zeta 电位变化和红外光谱图。由图可以看出, MONs 的氨基修饰使颗粒表面 Zeta 电位由 -16.9 mV 变为 +24.2 mV, 且红外图谱在 1472  $\text{cm}^{-1}$  处出现氨基的弯曲振动峰, 表明氨基成功修饰在 MONs 表面<sup>[27-28]</sup>。

由于 ICG 和 DNA 分子为负电荷, ICG/DOX 的装载和 DNA<sub>20</sub> 包封使得颗粒表面 Zeta 电位逐步降低。在 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 颗粒的红外图谱上出现酰胺键中  $-\text{C}=\text{O}-$  的特征振动峰(1640  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>[29]</sup>, 这是由于 DNA<sub>20</sub> 包封 ICG/DOX-MONs 颗粒是通过 DNA<sub>20</sub> 的 5'端羧基和 ICG/DOX-MONs 颗粒表面氨基之间的酰胺化反应实现的, 也证明 DNA<sub>20</sub> 的成功包封。另一方面, ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送系统制备过程各阶段颗粒的紫外-可见光光谱中

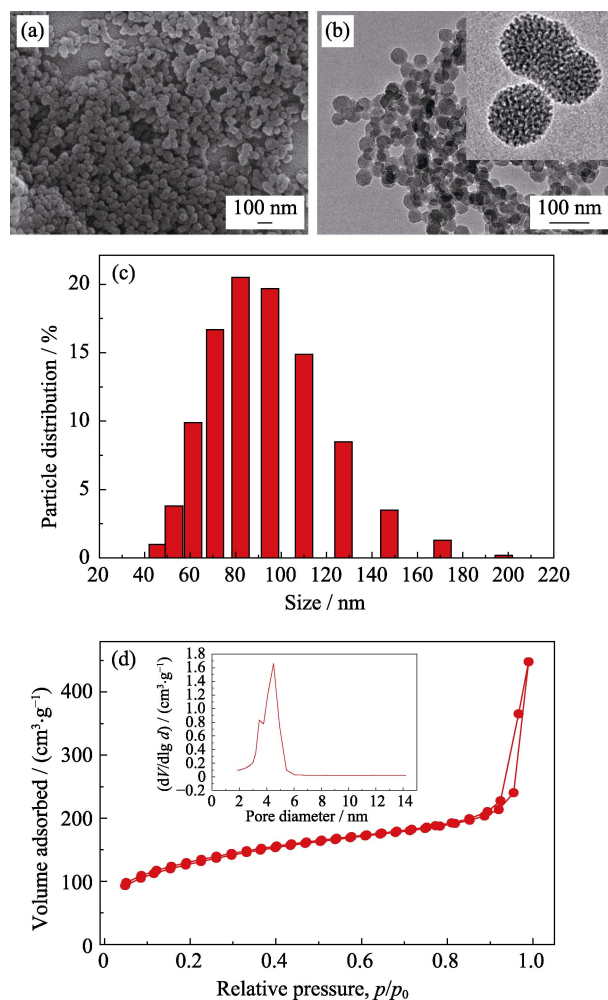


图 1 MONs 的形貌、结构表征

Fig. 1 Characterization of MONs

(a) SEM image of MONs; (b) TEM images of MONs; (c) DLS particle size distribution of MONs; (d)  $\text{N}_2$  adsorption-desorption isotherm and the corresponding pore size distribution of MONs

的特征吸收峰的变化也进一步表明 ICG/DOX 的装载和 DNA 包封的成功实现。同时, 利用紫外-可见光光谱分析计算, 得到 DOX 和 ICG 的装载量分别为 27.2 和 69.9  $\mu\text{g/mg}$ , 负载率分别为 8.2%和 21.0%。

### 2.3 纳米递送系统的光热性能

因 ICG 为 FDA 批准临床使用的医疗诊断菁染料, 具有光热效应。本研究将 ICG 装载于纳米递送系统, 赋予了纳米递送系统光热性能。图 3 为 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 颗粒的光热升温曲线。

由图可见, 在光功率密度为 0.75  $\text{W/cm}^2$  的近红外光照射下, 不同浓度的颗粒悬浮液温度随浓度增加而升高; 当颗粒悬浮液浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  时, 近红外光照射 6 min 可使悬浮液温度从 26  $^{\circ}\text{C}$  升至 50  $^{\circ}\text{C}$  (图 3(a))。另一方面, 在颗粒悬浮液浓度一定的情况下, 悬浮液温度随光功率密度增加而升高(图 3(b)), 即调节近红外光的光功率密度可以控制纳米递送系统的升温情况。因此, ICG 的光热效应没有因 MONs

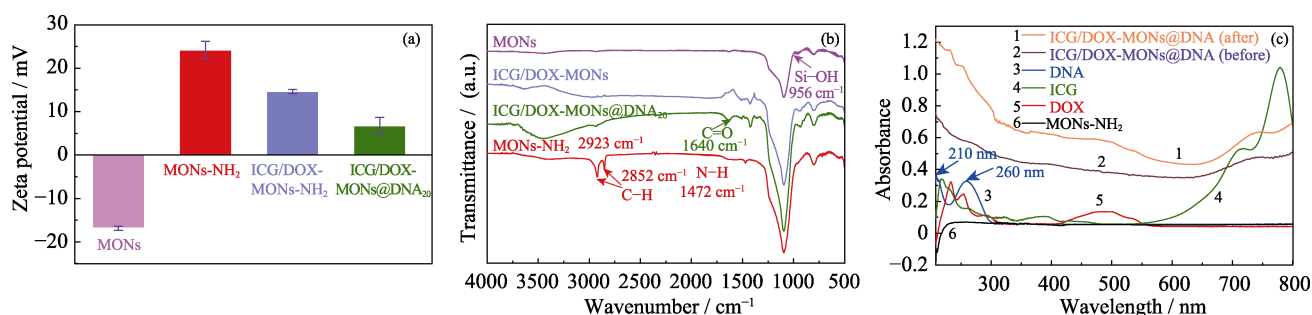


图 2 MONs、MONs-NH<sub>2</sub>、ICG/DOX-MONs 和 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米颗粒的 (a)Zeta 表面电位变化, (b)FT-IR 谱图, 及(c)UV-Vis 光谱图

Fig. 2 (a) Zeta potential, (b) FT-IR spectra and (c) UV-Vis spectra of MONs, MONs-NH<sub>2</sub>, ICG/DOX-MONs and ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> nanoparticles

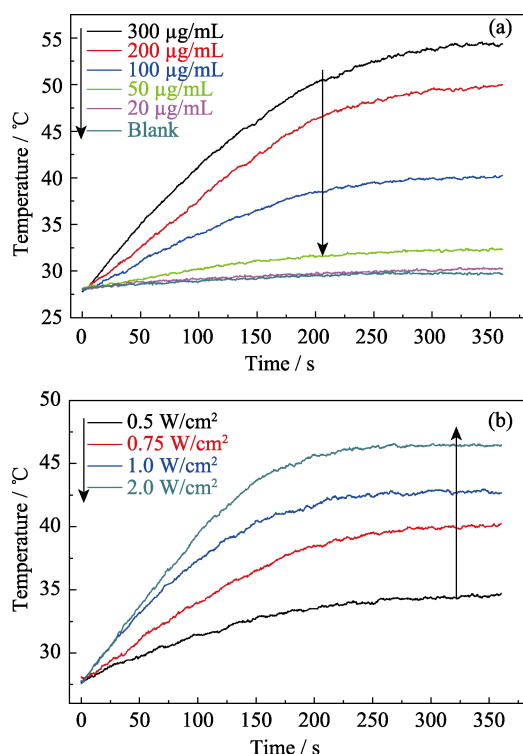


图 3 (a)不同浓度 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 悬浮液在 0.75 W/cm<sup>2</sup> 的近红外光照射下的光热升温曲线与 (b) 100 μg/mL 的 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 悬浮液在不同功率密度的近红外光照射下的光热升温曲线

Fig. 3 Photothermal heating curves of ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> suspension with different concentrations under NIR irradiation at 0.75 W/cm<sup>2</sup>, and (b) photothermal heating curves of 100 μg/mL ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> suspension under NIR irradiation at different power densities

的装载而失效, ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送系统的光热效应能满足光热治疗要求。另一方面, 热效应能够破坏 DNA<sub>20</sub> 与颗粒表面的作用力, 使得 DNA<sub>20</sub> 从颗粒表面脱附而打开颗粒的介孔孔道, 实现 DOX 和 ICG 的可控释放<sup>[24]</sup>。

## 2.4 纳米递送系统的药物释放性能

图 4(a,b)为 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送

系统在 37 和 43 °C 缓冲液中 DOX 和 ICG 的释放曲线。由图可见, 在 37 和 43 °C 的缓冲液中释放 6 h, DOX 的释放量分别为 12.3% 和 52.4%, ICG 的释放量分别为 26.4% 和 71.1%, 表明该纳米递送系统具有明显的温度控制释放性能, 即在 43 °C 下可快速释放 DOX 和 ICG, 而在 37 °C 下只能非常缓慢地释放 DOX 和 ICG。一方面, 这样的温度控制释放可一定程度上防止药物提前释放; 另一方面 43 °C 也达到了热疗温度范围, 纳米递送系统的光热效应满足周围温度达到 43 °C, 因而可实现光热诱导药物控制释放。

因 DNA<sub>20</sub> 的 5' 端羧基与颗粒表面氨基以酰胺键结合, 而其余部分则通过静电作用吸附于颗粒表面, 因此小范围的温度变化可破坏较弱的静电作用, 而不影响酰胺键结合<sup>[24]</sup>。所以通过小范围的温度变化有可能控制 DNA<sub>20</sub> 与颗粒表面的静电作用强弱, 从而实现 DNA<sub>20</sub> 包封介孔孔道的“开启”和“关闭”状态。图 4(c)为 ICG/DOX-MONs@DNA 纳米递送系统在 37~43 °C 交替温度条件下的 DOX 和 ICG 释放曲线。由图可见, 当温度从 37 °C 升高到 43 °C 并保持 1 h, DOX 和 ICG 都出现快速释放; 当温度从 43 °C 降至 37 °C 并保持 10 h, DOX 和 ICG 的释放则非常缓慢。重复升温 and 降温的条件, DOX 和 ICG 的释放情况呈现相似的趋势。因此, ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送系统可通过温度变化实现可逆的孔道“开启”和“关闭”状态, 更好地控制 DOX 和 ICG 的释放。

## 2.5 材料的细胞毒性及细胞吞噬

图 5 为 MONs 与 HeLa 细胞共培养 24 和 48 h 后的细胞毒性。由图可以看出, MONs 与细胞共培养 24 h 后, HeLa 细胞活性未受 MONs 影响, 即使颗粒浓度高达 200 μg/mL, 细胞存活率仍高达 98.4%。为了观察 MONs 在被细胞吞噬后对细胞的毒性影响, 对与 MONs 共培养 24 h 后的细胞去除未被吞噬的颗



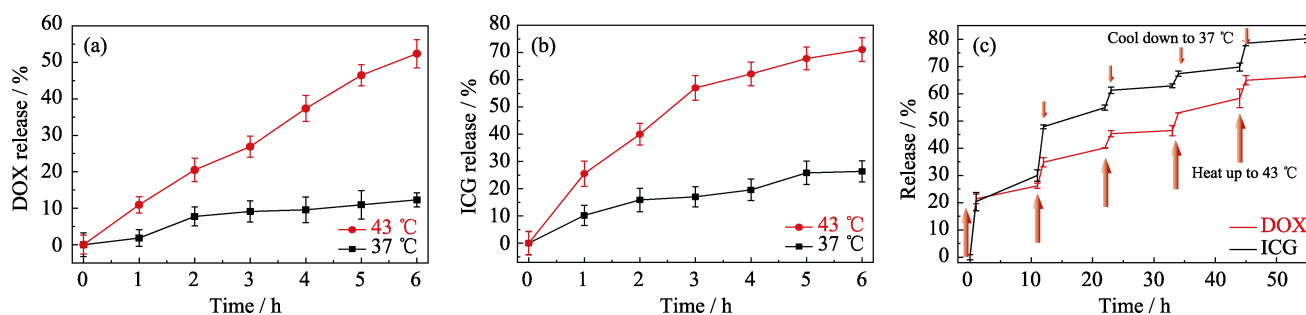


图 4 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 在 37 和 43 °C 条件下的 (a) DOX 和 (b) ICG 的释放曲线,

以及 (c) ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 在 37 和 43 °C 交替变温条件下的 DOX 和 ICG 的释放曲线

Fig. 4 Release profiles of (a) DOX and (b) ICG from ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> at 37 and 43 °C, respectively, and (c) release profile of DOX and ICG from ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> at the alternating temperature between 37 and 43 °C

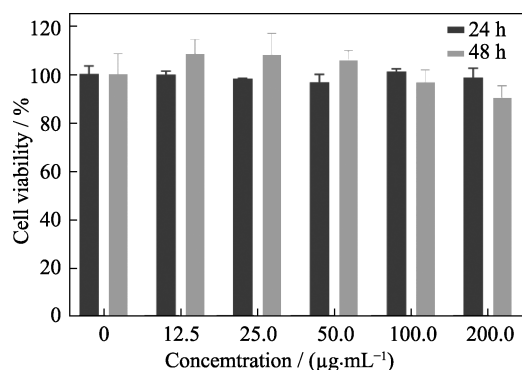


图 5 MONs 对 HeLa 细胞与不同浓度 MONs 共培养 24 和 48 h 后的细胞活性情况

Fig. 5 Cell viability of HeLa cells cultured with MONs with different concentrations for 24 and 48 h

粒, 继续培养 24 h 后测定细胞存活率。结果显示, MONs 被细胞吞噬后继续培养 24 h, HeLa 细胞的存活率与共培养 24 h 后的细胞存活率都没有显著性差异, 表明细胞在一定的颗粒浓度下吞噬 MONs 后不会对其细胞活性产生影响。因此, MONs 具有较低的细胞毒性。

肿瘤细胞吞噬纳米递送系统会对后续治疗效果产生重要影响。本研究采用倒置荧光显微镜观察了 HeLa 细胞吞噬颗粒的结果。如图 6 所示, 在激发光照射下的细胞核因被 DAPI 染色而发出蓝色荧光; 因 DOX 在激发光照射下发红色荧光, 对于 ICG/DOX-MONs 和 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 颗粒, 可观察到红色荧光紧密围绕着细胞核, 表明 HeLa 细胞能够吞噬 ICG/DOX-MONs 和 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 颗粒, 因而使 DOX 和 ICG 的肿瘤细胞内递送成为可能, 从而提高递送效率和肿瘤治疗效果。

## 2.6 药物化疗-光热联合治疗

为了进一步评估 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送系统的近红外光照激发药物释放的药物化疗联合光热治疗的效果, 以空白组和 ICG/DOX-MONs 组

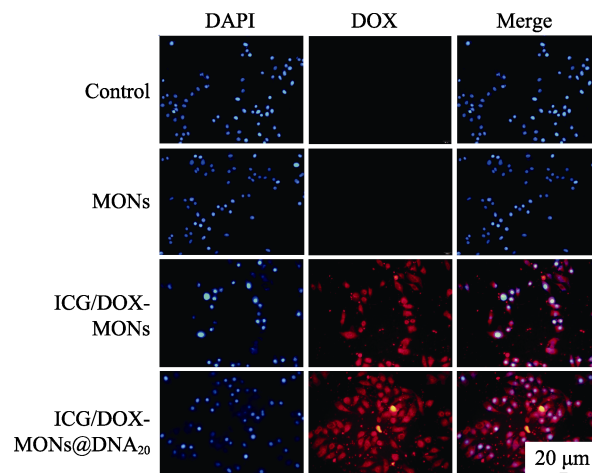


图 6 HeLa 细胞与不同颗粒共培养 3 h 后的细胞吞噬不同颗粒结果 (蓝色: 细胞核; 红色: DOX)

Fig. 6 Cell uptake of different nanoparticles after being cultured with HeLa cells for 3 h (blue: nuclei; red: DOX)

为对照组, 分别测定纳米递送系统与 HeLa 细胞共培养后在不光照、一次光照和两次光照条件下 HeLa 细胞的存活率。

如图 7 所示, 在无近红外光照条件下, ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 组无细胞毒性, 表明纳米递送系统的 DNA 包封可有效防止 DOX 大量泄漏; ICG/DOX-MONs 组则产生明显的细胞毒性, 这是由于 DOX 从颗粒中缓释而引起细胞死亡。经过一次近红外光照后, ICG/DOX-MONs 组的细胞活性下降了 25.1%, 而 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 组的细胞活性则由 94.0% 下降至 37.4%, 这是由于 DNA<sub>20</sub> 包封组在近红外光照后升高温度而释放孔道中的 DOX, 从而获得药物化疗-光热联合治疗效果; 而 ICG/DOX-MONs 颗粒由于提前释放 DOX, 近红外光照只产生光热治疗效果。经过两次近红外光照后, ICG/DOX-MONs 组的细胞活性基本不再下降, 这是由于 ICG 的光热不稳定性而造成光热治疗失效; ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 组的细胞活性仍下降了约

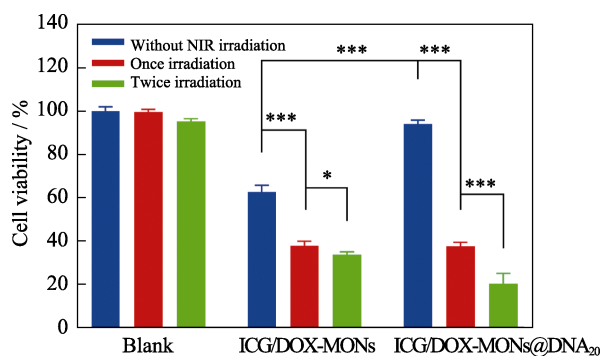


图 7 HeLa 细胞与 ICG/DOX-MONs 和 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 共培养后在有或无近红外光照下的细胞存活率

Fig. 7 Cell viabilities of HeLa cells cultured with ICG/DOX-MONs and ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> with or without NIR irradiation

\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$

17%, 这是由于第二次近红外光照将继续释放 DOX, 而且 ICG 因 MONs 保护而仍然具有光热效应, 因而继续发挥药物化疗-光热联合治疗效果。以上结果表明 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送系统能够将药物和光热剂高效递送到肿瘤细胞, 在近红外光照下获得药物化疗-光热联合治疗效果。

### 3 结论

本研究设计制备了以二硫键桥接的有机/无机杂化 MONs 为载体共装载化疗药物 DOX 和光热剂 ICG, 并以 DNA 分子包封 MONs 表面的 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送系统。在近红外光照射下, ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米颗粒具有光热效应, 能够产生热量使颗粒周围温度达到光热治疗的温度要求。另一方面, ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米颗粒在 37 °C 条件下仅缓慢释放 DOX 和 ICG, 而当温度升至 43 °C 时表现出 DOX 和 ICG 的快速释放, 因而具有光热诱导药物控制释放性能。细胞实验结果表明 ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送系统能够被肿瘤细胞吞噬, 并且在近红外光照下显示出明显的药物化疗-光热联合治疗效果。因此, ICG/DOX-MONs@DNA<sub>20</sub> 纳米递送系统在药物化疗-光热联合治疗肿瘤方面具有应用前景。

### 参考文献:

- [1] WEN JIA, YANG KUI, LIU FENG-YU, *et al.* Diverse gatekeepers for mesoporous silica nanoparticle based drug delivery systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews*, 2017, **46(19)**: 6024–6045.
- [2] ZHANG YA-RU, LIN RUN, LI HONG-JUN, *et al.* Strategies to improve tumor penetration of nano-medicines through nanoparticle design. *Wiley Interdisciplinary Reviews*, 2019, **11(1)**: e1519–1–12.
- [3] QIAO YI-TIAN, WAN JIAN-QIN, ZHOU LI-QIAN, *et al.* Stimuli-responsive nanotherapeutics for precision drug delivery and cancer therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews*, 2019, **11(1)**: e1527–1–20.

- [4] OVERCHUK MARTA, ZHENG GANG. Overcoming obstacles in the tumor microenvironment: recent advancements in nanoparticle delivery for cancer theranostics. *Biomaterials*, 2018, **156**: 217–237.
- [5] VANKAYALA RAVIRAJ, HWANG KUO-CHU. Near-infrared-light-activatable nanomaterial mediated phototheranostic nanomedicines: an emerging paradigm for cancer treatment. *Advanced Materials*, 2018, **30(23)**: 1706320–1–7.
- [6] HAYASHI KOICHIRO, MARUHASHI TAKUMA. One-pot synthesis of dual stimulus-responsive degradable hollow hybrid nanoparticles for imageguided trimodal therapy. *Advanced Functional Materials*, 2016, **26(47)**: 8613–8622.
- [7] WANG ZHENG, ZHANG FAN, SHAO DAN, *et al.* Janus nanobullets combine photodynamic therapy and magnetic hyperthermia to potentiate synergetic anti-metastatic immunotherapy. *Advanced Science*, 2019, **6(22)**: 1901690–1–10.
- [8] FAN WEN-PEI, LU NAN, HUANG PING. Glucose-responsive sequential generation of hydrogen peroxide and nitric oxide for synergistic cancer starving-like/gas therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, **56(5)**: 1229–1233.
- [9] FAN WEN-PEI, LU NAN, SHEN ZHE-YU. Generic synthesis of small-sized hollow mesoporous organo-silica nanoparticles for oxygen-independent X-ray-activated synergistic therapy. *Nature Communications*, 2019, **10(1)**: 1–14.
- [10] WU JIAN-RONG, BREMNER DAVID H, NIU SHI-WEI, *et al.* Chemodrug-gated biodegradable hollow mesoporous organosilica nanotheranostics for multi-modal imaging-guided low-temperature photo-thermal therapy/chemotherapy of cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, **10(49)**: 42115–42126.
- [11] LI ZHEN-LI, HAN JUN, YU LUO-DAN, *et al.* Synergistic sonodynamic/chemotherapeutic suppression of hepatocellular carcinoma by targeted biodegradable mesoporous nanosensitizers. *Advanced Functional Materials*, 2018, **28(26)**: 1800 145–1–16.
- [12] LI LING, YANG ZHEN, FAN WEN-PEI, *et al.* In situ polymerized hollow mesoporous organosilica bio-catalysis nanoreactor for enhancing ROS-mediated anticancer therapy. *Advanced Functional Materials*, 2020, **30(4)**: 1907716–1–11.
- [13] CHEN JIA-JIE, LIU JIA-XING, HU YA-PING, *et al.* Metal-organic framework-coated magnetite nano-particles for synergistic magnetic hyperthermia and chemotherapy with pH-triggered drug release. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2019, **20(1)**: 1043–1054.
- [14] FAN WEN-PEI, YUNG BRYANT, HUANG PING. Nanotechnology for multimodal synergistic cancer therapy. *Chemical Reviews*, 2017, **117(22)**: 13566–13638.
- [15] PRASAD MINAKSHI, LAMBE UPENDRA P, *et al.* Nanotherapeutics: an insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, **97**: 1521–1537.
- [16] KOTARO MATSUMOTO, TAN LE HOANG DOAN, NGOC XUAN DAT MAI, *et al.* Anticancer drug delivery capability of biodegradable PMO in the chicken egg tumor model. *Enzymes*, 2018, **44**: 103–116.
- [17] AGRAWAL GARIMA, AGRAWAL RAHUL. Janus nanoparticles: recent advances in their interfacial and biomedical applications. *ACS Applied Nano Materials*, 2019, **2(4)**: 1738–1757.
- [18] MA BAO-YUAN, TIAN ZHENG-FANG, ZHU YU-FANG. Biodegradable silicon-based mesoporous nanoparticles for nanomedicine. *Journal of Bio-analysis & Biomedicine*, 2018, **10(6)**: e159.
- [19] TANG WEI, FAN WEN-PEI, WANG ZHAN-TONG. Acidity/reducibility dual-responsive hollow mesoporous organosilica nanoplateforms for tumor-specific self-assembly and synergistic therapy. *ACS Nano*, 2018, **12(12)**: 12269–12283.

- [20] HUANG PING, CHEN YU, HAN LIN, *et al.* Molecularly organic/inorganic hybrid hollow mesoporous organosilica nanocapsules with tumor-specific biodegradability and enhanced chemotherapeutic functionality. *Biomaterials*, 2017, **125**: 23–37.
- [21] YU LUO-DAN, CHEN YU, LIN HAN, *et al.* Ultra-small mesoporous organosilica nanoparticles: morphology modulations and redox-responsive bio-degradability for tumor-specific drug delivery. *Biomaterials*, 2018, **161**: 292–305.
- [22] JONAS G CROISSANT, YEVHEN FATIEIEV, ABDULAZIZ ALMALIK, *et al.* Mesoporous silica and organosilica nanoparticles: physical chemistry, biosafety, delivery strategies, and biomedical applications. *Advanced Healthcare Materials*, 2018, **7**(4): 1700831–1–75.
- [23] FENTON OWEN S, OLAFSON KATY N, PILLAI PADMINI S, *et al.* Advances in biomaterials for drug delivery. *Advanced Materials*, 2018, **30**(29): 1705328–1–29.
- [24] XU YI, ZHU YU-FANG, KASKEL STEFAN. A smart magnetic nanosystem with controllable drug release and hyperthermia for potential cancer therapy. *RSC Advances*, 2015, **5**(121): 99875–99883.
- [25] HUANG PING, QIAN XIAO-QIN, CHEN YU, *et al.* Metalloporphyrin-encapsulated biodegradable nano-systems for highly efficient magnetic resonance imaging-guided sonodynamic cancer therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, **139**(3): 1275–1284.
- [26] TAO CUI-LIAN, ZHU YU-FANG, XU YI, ZHU MIN, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles for enhancing the delivery efficiency of immuno-stimulatory DNA drugs. *Dalton Trans*, 2014, **43**(13): 5142–1–50.
- [27] LAI XIN, SUN DAN, HOU YI, *et al.* Amino-functionalized multilayer core-shell mesoporous organo-silica nanospheres for Cr(VI) removal. *Advanced Materials Interfaces*, 2018, **5**(18), 180 0630–1–11.
- [28] HU LIN-LIN, MENG JIE, ZHANG DAN-DAN, *et al.* Functionalization of mesoporous organosilica nano-carrier for pH/glutathione dual-responsive drug delivery and imaging of cancer therapy process. *Talanta*, 2018, **177**: 203–211.
- [29] DOUSTKHAH ESMAIL, MOHTASHAM HAMED, FARAJZADEH MUSTAFA, *et al.* Organosiloxane tunability in mesoporous organosilica and punctuated Pd nanoparticles growth; theory and experiment. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2020, **293**: 109832–1–8.