高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

乏氧激活化疗药物AQ4N与碳点自组装用于化疗联合声动力治疗肿瘤

庞　娥[1], 唐垣钰[1], 赵少静[1], 程　强[1], 王　晨[1], 陈健敏[2], 蓝敏焕[1]
(1. 中南大学化学化工学院, 微纳材料界面科学湖南省重点实验室, 长沙 410083;
2. 莆田学院药学院, 福建省高校药物分析与检验医学重点实验室, 莆田 351100)

摘要　合成了一种具有声敏活性的红色荧光碳点(CDs), 将乏氧激活化疗药物AQ4N与CDs通过静电相互作用、氢键和π-π相互作用组装, 制备了CDs@AQ4N纳米组装体. CDs@AQ4N在超声辐照下可有效产生单线态氧($^1O_2$)用于声动力治疗(SDT). SDT过程消耗肿瘤内氧气进一步加剧了肿瘤乏氧, 从而激活AQ4N, 将其转化为具有细胞毒性的AQ4, 在小鼠肿瘤模型下实现了荧光成像指导下的SDT联合化疗. 小鼠主要器官切片、血常规和血液生化分析结果均证实CDs@AQ4N具有优异的生物安全性.

关键词　碳点; 乏氧激活; 声动力治疗; 化疗; 协同治疗
中图分类号　O615.4　　**文献标志码**　A　　doi: 10.7503/cjcu20240489

Hypoxia Activated Chemotherapy Drug AQ4N and Carbon Dots Self-assembly for Chemotherapy Combined with Sonodynamic Therapy of Tumors

PANG E[1], TANG Yuanyu[1], ZHAO Shaojing[1], CHENG Qiang[1], WANG Chen[1], CHEN Jianmin[2*], LAN Minhuan[1*]
(*1. Hunan Provincial Key Laboratory of Micro & Nano Materials Interface Science, College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha* 410083, *China*;
2. School of Pharmacy, Putian University, Key Laboratory of Pharmaceutical Analysis and Laboratory Medicine, Fujian Province University, Putian 351100, *China*)

Abstract　A red fluorescent carbon dots (CDs) with sonodynamic activity were synthesized, and the CDs@AQ4N nano-assemblies were prepared by assembling the hypoxia-activating drug AQ4N, with CDs *via* electrostatic interaction, hydrogen bonding, and π-π interactions. CDs@AQ4N could effectively generate singlet oxygen ($^1O_2$) for sonodynamic therapy (SDT) of cancer cells. Moreover, the depletion of intra-tumor oxygen during SDT further exacerbated the tumor hypoxia, which activated AQ4N and converted it into cytotoxic AQ4, enabling fluorescence-imaging-guided combination of SDT and chemotherapy for the treatment of mice tumors. The excellent biosafety of

收稿日期: 2024-10-31. 网络首发日期: 2024-12-09.
联系人简介: 蓝敏焕, 男, 博士, 教授, 主要从事光响应分子/纳米材料的设计、合成及其在荧光传感、荧光成像、荧光标记及光驱动疾病诊疗/抗菌等领域的应用研究. E-mail: minhuanlan@csu.edu.cn
陈健敏, 男, 博士, 教授, 主要从事微针经皮给药系统研究和酶抑制剂方面的研究. E-mail: chenjianmin1985@sina.com
基金项目: 国家重点研发计划项目(批准号: 2022YFA1207600)、国家自然科学基金(批准号: 62375289, 62175262)、湖南省重点研发计划项目(批准号: 2022SK2101, 2023NK2029)和福建省高校药物分析与检验医学重点实验室(莆田学院)开放课题(批准号: PALM 202201)的资助.
Supported by the National Key Research and Development Program of China(No.2022YFA1207600), the National Natural Science Foundation of China(Nos. 62375289, 62175262) and the Key Laboratory of Pharmaceutical Analysis and Laboratory Medicine(Putian University), Fujian Province University, China(No.PALM 202201).

CDs@AQ4N was confirmed by mouse major organ sections, blood routine and blood biochemical analyses.

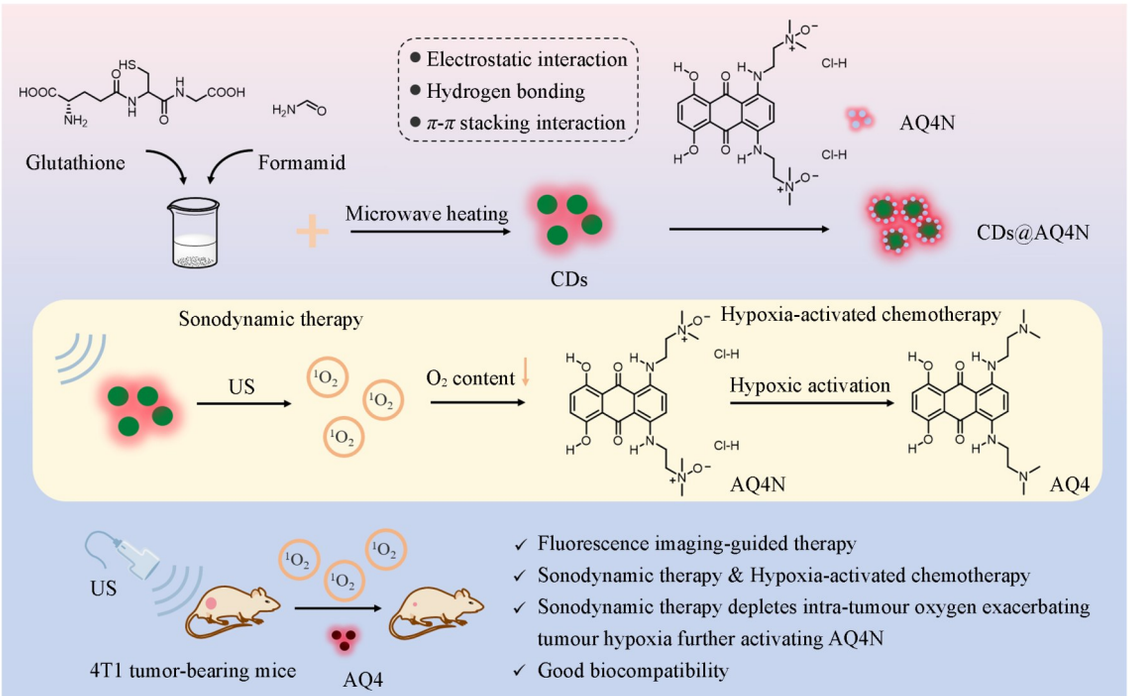
Keywords Carbon dots; Hypoxic activation; Sonodynamic therapy; Chemotherapy; Synergistic therapy

声动力治疗(SDT)是一种利用声敏剂在超声(US)辐照下产生活性氧物种(ROS)杀灭肿瘤细胞,实现肿瘤治疗的新型疗法[1]. SDT具有组织穿透尺度深、治疗选择性高、无耐药性、毒副作用小、非侵入性及患者依从性好等优点. 此外,超声波的机械效应、热效应和理化效应等可以提高药物的扩散能力,促进药物向深部肿瘤细胞渗透;改善细胞膜的通透性,促进肿瘤细胞对药物的摄取;增强血管的通透性,提高药物被动靶向效率[2]. SDT产生的ROS可摧毁肿瘤表面的组织屏障涂层,使声敏剂或药物分子更好地渗入深部肿瘤组织,对深部肿瘤治疗具有独特优势[3]. 目前报道的声敏剂大多从有机光敏剂发展而来,如卟啉、姜黄素和吲哚菁绿等,其在超声激发下可产生ROS[4,5]. 但是大部分有机声敏剂存在着自身缺陷,如超声稳定性差,在超声照射下容易分解;较差的水溶性,不利于体内循环;较高的光毒性,容易诱导皮肤病变;较弱的肿瘤组织靶向能力和超声激发下较低的ROS产生效率不利于SDT优势的发挥[6,7]. 因此,设计合成高性能声敏剂已成为SDT研究领域中的关键问题.

纳米材料具有良好的体内稳定性和水分散性,易实现多功能性和较高的肿瘤靶向性等特点,在药物递送和肿瘤诊疗领域显示出巨大的应用前景[8,9]. 碳点(CDs)是一种新型的碳基零维纳米材料,表面富含氨基、羧基和羟基等功能性基团,具有水溶性好、生物相容性高、表面基团丰富、易修饰、光学和理化性质易调控等优点,可被广泛应用于药物递送、生物成像及肿瘤治疗等领域[10~13]. 近年来,超声激发可以产生ROS的CDs也被陆续报道. 如,Hu等[14]研究发现,超声产生的空化效应可以破坏CDs表面的含氧官能团并产生ROS,在最优条件下其ROS产率比纳米声敏剂TiO_2高2倍. 该CDs超声激发产生ROS的效率受溶液的pH影响较大,同时超声也会改变CDs溶液的pH. Ding等[15]发现氮掺杂石墨烯量子点(CDs的一种)具有优异的声敏活性,超声激发下的ROS生成效率为传统声敏剂的3~5倍,推测吡咯氮和吡啶氮是其超声激活化学过程的活性反应位点. Pang等[16]报道了一类具有窄带隙(1.62 eV)和长效激发三重态(11.4 μs)的近红外磷光CDs并用于SDT. Zhao等[17]以IR-780光敏剂为碳源制备的CDs在超声激发下也可以有效产生单线态氧($^1O_2$).

为进一步提高CDs声动力治疗小鼠肿瘤的效果,Tan等[18]通过在石墨烯量子点(CDs的一种)表面修饰大位阻的水溶性基团以阻止石墨烯量子点之间的聚集并提高其水溶性,从而提高了量子点在超声辐照下产生ROS的效率. Yeh等[19]利用三油酸甘油酯为碳源制备CDs,并将CDs与微泡组装有效提高了CDs超声照射产生ROS的效率. 然而,肿瘤组织具有血管系统紊乱、渗透压高和细胞外基质高度黏稠等特点,阻碍了包括声敏剂在内的药物分子进入肿瘤细胞,削弱了SDT对实体肿瘤的疗效. 结合SDT可以有效提高药物递送效率、化疗药物对原发灶和转移灶的治疗作用,发展化疗与SDT的联合疗法有望实现对深部肿瘤和转移肿瘤的有效治疗[20,21]. Zhu等[22]以叶酸为碳源制备了超声激发下可产生$^1O_2$的CDs,将化疗药物(DOX)负载在CDs表面并用对酸性和谷胱甘肽(GSH)敏感的聚合物包裹,构筑了可在肿瘤部位释放DOX的CDs声敏药物,用于化疗联合声动力治疗肿瘤. 需要注意的是,SDT过程中会消耗大量的氧气,而且会破坏肿瘤血管,阻断肿瘤部位的氧气供应,经SDT治疗后的肿瘤组织乏氧情况加剧,可能导致肿瘤新生血管及乏氧诱导因子的形成,从而诱发肿瘤细胞的复发、侵袭和转移,这成为了肿瘤难以治愈的根本原因之一. 如何克服SDT治疗后的乏氧微环境,并利用乏氧微环境提高肿瘤治疗效果,是SDT走向临床应用的关键.

本文合成了一种具有红色荧光发射的声动力活性CDs(见本文支持信息图S1),其荧光量子产率(Φ_{em})为7.8%[以酞菁锌为参比(Φ_{em}=30%)]. 通过静电相互作用、氢键和π-π相互作用将CDs与乏氧激活化疗药物AQ4N自组装,制备了CDs@AQ4N纳米组装体. CDs@AQ4N在US辐照下可有效产生$^1O_2$实现SDT;SDT过程消耗肿瘤内氧气进一步加剧肿瘤乏氧,从而激活AQ4N,将其转化为具有细胞毒性的AQ4,对乏氧激活化疗具有持续正向反馈(Scheme 1). 体内外实验结果证明,CDs@AQ4N可实现荧光成像指导下的SDT联合化疗小鼠肿瘤. 小鼠主要器官切片、血常规和血液生化分析结果均证实CDs@AQ4N具有优异的生物安全性.



Scheme 1 Preparation process of CDs@AQ4N, therapeutic mechanism and its advantages in tumor therapy

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

还原型谷胱甘肽(GSH)，分析纯，购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；巴诺蒽醌(AQ4N)，化学纯，购于上海毕得医药科技股份有限公司；甲酰胺，分析纯、[9,10-蒽二基-双(亚甲基)二甲酸](ABDA)，化学纯、2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)，化学纯，购于上海麦克林生化技术有限公司；钙黄绿素(Calcein AM)、碘化丙啶(PI)试剂盒，3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四氮唑(MTT)，化学纯，天津希恩斯生化科技有限公司；三菱厌氧产气袋(D-06/C-35)，购于上海泰坦科技股份有限公司.

M1-L213B型微波加热反应器，中国美的公司；UV-2600型紫外-可见吸收分光光度计、RF-6000型荧光光谱仪，日本岛津公司；Talos F200X G2型透射电子显微镜，Thermo SCIENTIFIC Nexsa型X射线光电子能谱，香港赛默飞世尔公司；zeta-sizer Nano-ZS型Zeta电位仪，英国马尔文仪器公司；TGA/STA8000-FTIR-GCMS-ATD型红外光谱仪，美国珀金埃尔默公司；Leica DMIL LED型倒置荧光显微镜，日本奥林巴斯株式会社；UT1021型佩维丝超声波治疗仪，深圳东迪欣科技有限公司.

1.2 实验过程

1.2.1 CDs的合成 称取0.3 g还原型谷胱甘肽溶解于10 mL甲酰胺中，超声3 min后置于微波反应加热器中，高热加热10 min得到绿色固体. 向其中加入30 mL水，并在超声下溶解得到CDs粗产品. 将CDs粗产品置于离心机中，以9000 r/min转速离心10 min，收集上层清液，用0.22 μm水相滤膜过滤，最后使用1000 Da的透析袋透析24 h，获得CDs.

1.2.2 CDs@AQ4N的制备 称取1 mg(2 mmol)的AQ4N溶解于1 mL水中，将1 mL 2 mmol/mL AQ4N水溶液在超声下注入CDs水溶液中，超声5 min后，以150 r/min转速磁力搅拌24 h，然后使用500 Da的透析袋透析24 h，获得CDs@AQ4N水溶液.

1.2.3 紫外-可见光吸收光谱测试 将2 mL CDs(62 μg/mL)，AQ4N(58 μmol/L)和CDs@AQ4N(透析后CDs浓度为47 μg/mL，AQ4N浓度为22 μmol/L)水溶液加入比色皿中，测试其紫外-可见吸收光谱.

1.2.4 荧光光谱测试 将2 mL CDs(26 μg/mL)，AQ4N(15 μmol/L)和CDs@AQ4N(透析后CDs浓度为26 μg/mL，AQ4N浓度为15 μmol/L)水溶液加入比色皿中，测试其荧光光谱，λ_{ex}=620 nm，狭缝为5 nm.

1.2.5 CDs与CDs@AQ4N的$^1O_2$测试 在2 mL CDs，AQ4N和CDs@AQ4N水溶液(CDs浓度为38 μg/mL，AQ4N浓度为21 μmol/L)中加入20 μL 1 mg/mL ABDA-Na_2(将1 mg ABDA溶于1 mL 1 mmol/L NaOH中，制得ABDA-Na_2)，每2 min超声辐照一次(测试条件：1 W/cm^2，100%占空比，1 MHz)，并扫描紫外-可见吸收光谱.

1.2.6 细胞内$^1O_2$成像 将4T1细胞均匀种植于6孔板中，当细胞密度生长至约80%时，将细胞置于乏氧环境(乏氧袋)中预处理2 h. 将细胞分为4组，分别为PBS组、PBS+US组、CDs@AQ4N组和CDs@AQ4N+US. 向每孔细胞中分别加入PBS缓冲液或CDs@AQ4N，孵育4 h，再分别加入20 μL DCFH-DA，孵育30 min后，对US组进行相应的超声处理(测试条件：1 W/cm^2，100%占空比，1 MHz). 30 min后，用PBS缓冲液洗涤3次，随后在荧光倒置显微镜下成像.

1.2.7 Calcein AM/PI细胞成像 将4T1细胞均匀种植于6孔板中，当细胞密度生长至约80%时，将细胞分为4组，分别为PBS组、PBS+US组、CDs@AQ4N组和CDs@AQ4N+US组. 向细胞中加入PBS或CDs@AQ4N，孵育4 h，然后加入Calcein AM和PI染料，孵育30 min，然后进行相应的超声处理(测试条件为：1 W/cm^2，100%占空比，1 MHz，每次持续2 min). 30 min后，用PBS缓冲液洗涤3次，随后在荧光倒置显微镜下成像.

1.2.8 常氧细胞活力实验 将4T1细胞均匀种植于96孔板中，当细胞密度生长至约80%时，向细胞中加入含不同浓度CDs@AQ4N和1640培养基的混合溶液.(1)常氧细胞超声/化疗毒性实验：在加入CDs@AQ4N 4 h后，进行超声处理，超声条件：1 W/cm^2，100%占空比，1 MHz，30 s，再孵育20 h；(2)常氧细胞暗毒性实验：加入CDs@AQ4N孵育时间24 h后，加入MTT/1640培养基混合溶液(体积比为9∶1)孵育4 h，再加入200 μL DMSO，采用酶标仪进行测试(λ_{ex}=490 nm).

1.2.9 乏氧细胞活力实验 将4T1细胞均匀种植于96孔板中，当细胞密度生长至约80%时，将细胞置于乏氧环境(乏氧袋)中预处理2 h，然后向细胞中加入含不同浓度的CDs@AQ4N/1640培养基混合溶液，并更换乏氧袋，后续实验均在乏氧环境中完成，其余操作均与1.2.8节相同.

1.2.10 动物模型 所有动物实验均经湖南师范大学伦理委员会批准进行(No. D2024026). 25只雄性裸鼠购自集萃药康生物科技股份有限公司. 向小鼠皮下注射4T1乳腺癌肿瘤细胞建立4T1荷瘤小鼠模型，14 d后，待肿瘤体积生长至800 mm^3，将其剥离并进行分割(尺寸约为2 mm×2 mm×2 mm)，将分割的小体积肿瘤包埋至健康裸鼠皮下，7 d后进行治疗.

1.2.11 体内抗肿瘤实验 将20只肿瘤体积为80 mm^{3}的4T1荷瘤裸鼠随机分为4组，每组5只，分别为PBS组、PBS+US组、CDs@AQ4N组和CDs@AQ4N+US组. 在治疗初始，将小鼠麻醉，瘤内注射100 μL PBS缓冲液或CDs@AQ4N(CDs浓度为3 μg/mL，AQ4N浓度为1.34 μmol/L)，10 min后进行超声处理(超声条件：1 W/cm^2，100%占空比，1 MHz，5 min). 在第2天对小鼠再次治疗，每2天监测一次小鼠肿瘤体积与体重，持续14 d.

1.2.12 体内荧光成像 将4T1荷瘤小鼠麻醉后，向小鼠右侧肿瘤中注射100 μL CDs@AQ4N溶液，然后在小动物成像仪下进行荧光成像(λ_{ex}=600 nm，λ_{em}=670 nm).

1.2.13 切片实验 小鼠在治疗14 d后被处死，对小鼠进行解剖，提取小鼠的主要器官(心肝脾肺肾)和肿瘤，并将其保存于4%多聚甲醛固定液中，送至武汉赛维尔生物科技有限公司进行切片染色处理.

1.2.14 小鼠血液分析 小鼠治疗14 d后，通过眼眶取血，收集约500 μL血液样本，送至长沙焕彩流式有限公司进行小鼠肝肾功能和血常规测试.

1.2.15 数据统计分析 数据以平均值±标准差(SD，n=5)表示. 误差条代表独立检测样本的标准差，使用GraphPad Prism 8.0软件(美国GraphPad软件公司)进行统计分析. 显著性由单向方差分析和Tukey′s多重比较检验确定，*p<0.05，**p<0.01，ns代表无显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 CDs的表征

通过透射电子显微镜(TEM)对CDs的形貌进行了表征. 如图1(A)所示, CDs呈均匀的球形, 直径约为3.5 nm[图1(B)], 高分辨率TEM(HRTEM)图像显示晶格间距为0.20 nm, 表明其结晶度较高[图1(A)插图]. 通过X射线光电子能谱(XPS)分析了CDs的元素组成和化学键. 如图1(C)所示, CDs中存在C, N, O和S峰, 结合对CDs不同元素的XPS峰解卷积分析CDs中存在大量的—C—O, —C═O, —C—N, —C═N, —N—H和—O—H等化学键[图1(D)~(F)]. 此外, 在傅里叶变换红外光谱图[图1(G)]中可观察到—O—H键在3393 cm^{-1}处, —N—H键在3188 cm^{-1}处, —C═O键在1675 cm^{-1}处, —C═C和—C—N键在1600 cm^{-1}处, 以及—C—O键在1230 cm^{-1}处的吸收峰. 以上结果表明, CDs表面存在—OH, —COOH及—NH_2基团[23~25].

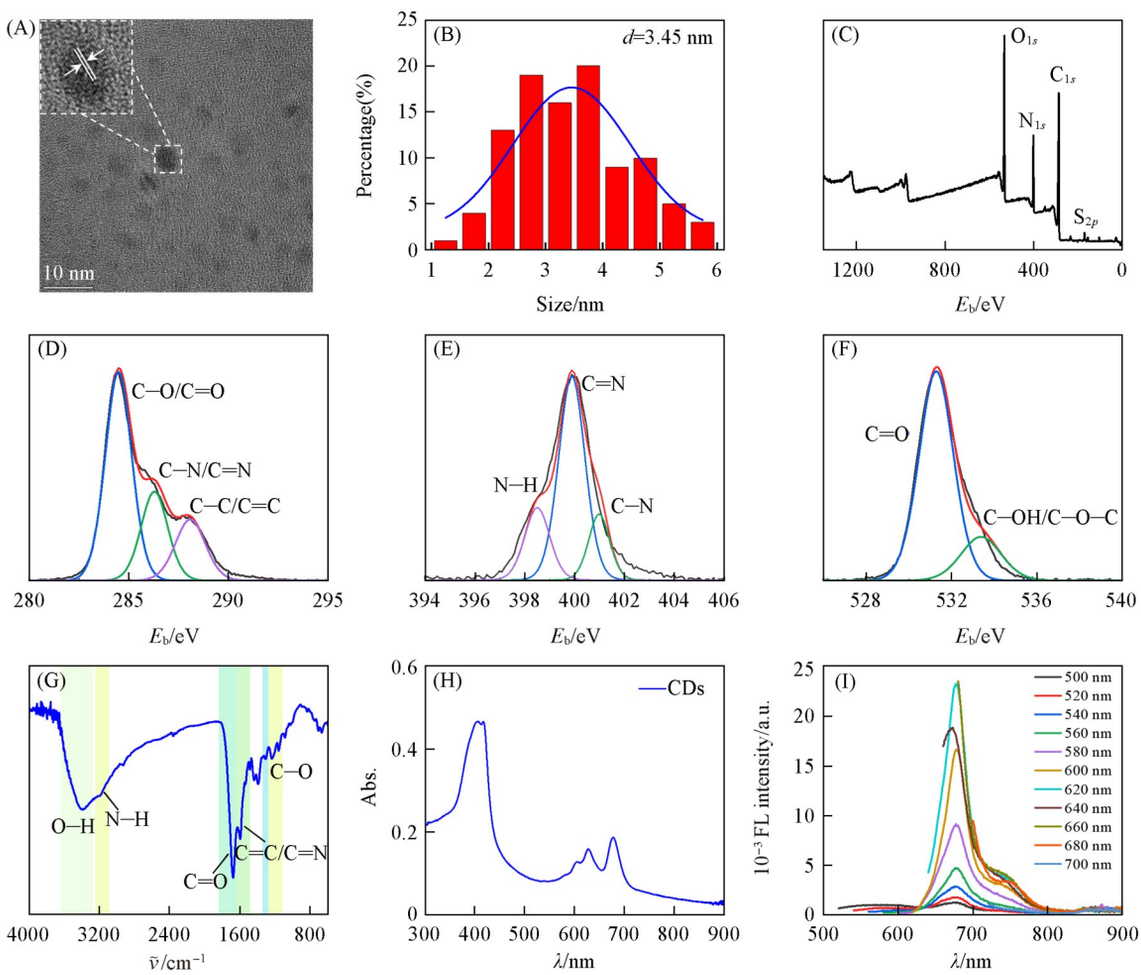


Fig. 1 TEM, XPS, FTIR characterizations of CDs

(A) TEM images of CDs(insert shows the HRTEM of CDs); (B) size distribution statistics; (C) XPS spectra of CDs; (D—F) the deconvolution of high resolution C_{1s}, N_{1s}, O_{1s} XPS spectra of CDs, respectively; (G) FTIR spectra; (H) UV-Vis absorption spectrum; (I) fluorescence spectra at different excitation wavelengths of CDs.

紫外-可见吸收光谱显示CDs在300~900nm范围内具有全谱吸收, 其峰值位于410, 581, 604, 627和678 nm处[图1(H)]. CDs的荧光发射峰位于676 nm处, 随着激发波长由500 nm增大至700 nm, 荧光强度先增加后降低, 在620 nm光激发下达到最强的荧光发射, 未表现出明显的波长依赖性[图1(I)], CDs在近红外区域的吸收和荧光发射使其具有应用于小动物活体荧光成像的潜力.

2.2 CDs@AQ4N的组装与声动力活性测试

CDs可通过静电相互作用、氢键及π-π相互作用与AQ4N组装[图2(A)]. 如图2(B)所示，CDs的Zeta电势约为－6 mV，AQ4N的Zeta电势约为14.5 mV，CDs@AQ4N组装体的Zeta电势约为7.7 mV，表明CDs和AQ4N已通过静电作用成功组装. CDs与AQ4N组装前后的归一化紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱(相同浓度下的吸收光谱见本文支持信息图S2，CDs与AQ4N的浓度标准曲线如本文支持信息图S3和S4)也证明了CDs与AQ4N的成功组装. 如图2(C)所示，CDs@AQ4N的吸收光谱同时显示出CDs和AQ4N的吸收峰；而CDs的荧光发射峰位于676 nm处，AQ4N的荧光发射峰位于690和740 nm处，但AQ4N的荧光强度相对较弱[图2(D)插图]. 在组装完成后，CDs@AQ4N中源于CDs的荧光发生明显猝灭[图2(D)]，这可能是由于CDs与AQ4N的π-π相互作用导致CDs聚集荧光猝灭. 实验中采用9,10-蒽二基-双(亚甲基)二甲酸钠(ABDA-Na_2)作为$^1O_2$捕获剂，对CDs及CDs@AQ4N的声动力性能进行了评估. 如图2(E)所示，CDs与ABDA-Na_2混合溶液的吸收光谱显示，随着超声照射时间的增加，ABDA-Na_2的吸收峰降低，表明在超声照射下CDs能够产生大量的$^1O_2$. 在相同条件下测试了AQ4N与ABDA-Na_2混合溶液的吸收光谱，结果显示AQ4N同样具有声敏剂活性(见本文支持信息图S5)，而CDs@AQ4N组装体则显示出比单独的CDs或AQ4N更强的声动力活性[图2(F)~(G)].

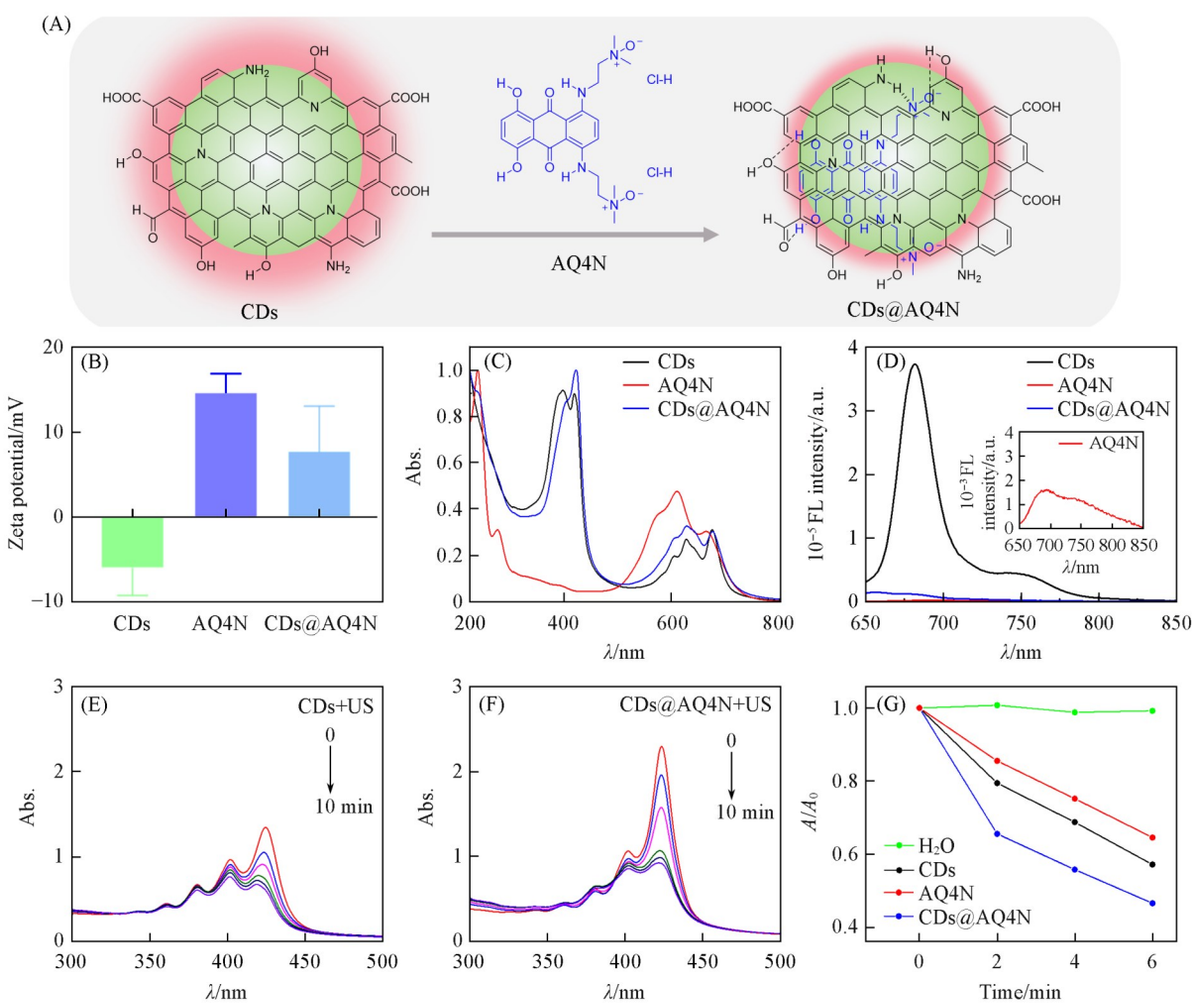


Fig. 2 Assembly of CDs with AQ4N and the $^1O_2$ generating capacity assay

(A) The schematic representation of the self-assembly of CDs and AQ4N through hydrogen bonding, π-π interactions and electrostatic interactions; (B) Zeta potential diagram of CDs, AQ4N and CDs@AQ4N; (C) Normalized UV-Vis absorption spectra; (D) fluorescence spectra of CDs (black), AQ4N (red) and CDs@AQ4N (blue); absorption spectra of ABDA-Na_2 in the presence of CDs (E) and CDs@AQ4N (F) under US irradiation (1.0 W·cm^{-2}, 100% duty cycle, 1 MHz, 10 min); (G) the absorption decay rate of ABDA-Na_2.

2.3 CDs@AQ4N的体外抗肿瘤活性

采用2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)作为细胞内ROS探针，在体外细胞内验证了CDs@AQ4N产生ROS的能力. 如图3(A)所示，CDs@AQ4N+US组的4T1细胞显示出明亮的绿色荧光，而其余3个对照组(PBS组、PBS+US组和CDs@AQ4N组)细胞中则未观察到明显荧光，表明CDs@AQ4N在超声照射下能够在细胞内产生$^1O_2$. 为了进一步评估CDs@AQ4N对肿瘤细胞的声动力毒性和乏氧化疗毒性，利用钙黄绿素-AM/碘化丙啶(Calcein AM/PI)对经不同处理后的4T1细胞的活/死情况进行了可视化分析. 如图3(B)所示，与PBS组和PBS+US组相比，CDs@AQ4N组的部分细胞发出红色荧光，表明CDs@AQ4N组有少部分细胞死亡，这是由于AQ4N在乏氧下激活化疗作用所致；而CDs@AQ4N+US组的大部分细胞均发出明亮的红色荧光，表明在CDs的声动力作用协同下，CDs@AQ4N+US组对肿瘤细胞具有较好的抑制作用.

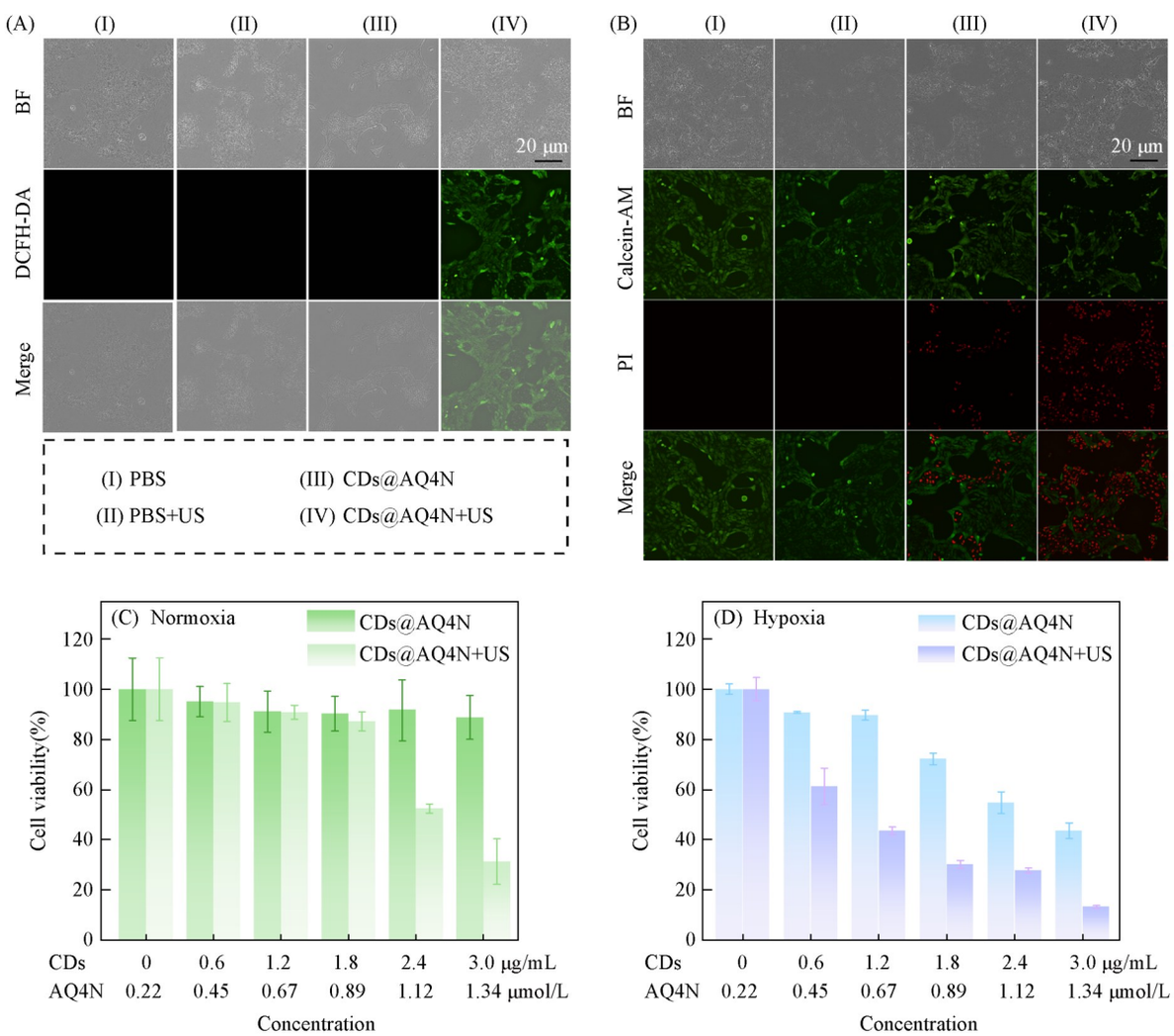


Fig. 3 ***In vitro*** **cellular experiments in different treatment groups**

Fluorescence images of 4T1 cells were stained using DCFH-DA probe(A) or Calcein AM/PI(B) after different treatments; the viability of 4T1 cells was incubated using different concentrations of CDs@AQ4N in normoxic(C) and hypoxic condition (D) with or without US irradiation(1.0 W/cm^2, 100% duty cycle, 30 s).

为了对CDs@AQ4N的细胞毒性、声动力性能和乏氧化疗毒性进行定量评估，采用MTT法测试了不同条件、不同浓度下细胞的存活率. 如图3(C)所示，在常氧条件下，CDs@AQ4N未显示出明显的细胞毒性，细胞活力约为90%，说明CDs具有良好的生物相容性，且AQ4N的化疗毒性在常氧条件下没有被激活；当CDs@AQ4N中CDs和AQ4N的浓度分别为3 μg/mL和1.34 μmol/L时，在超声照射下，细胞活

力降低至约35%，这是CDs的声动力效应导致的．如图3(D)所示，在乏氧条件下，当CDs@AQ4N中CDs和AQ4N的浓度分别为3 μg/mL和1.34 μmol/L时，即使没有超声照射，CDs@AQ4N也显示出明显的化疗毒性，细胞活力降低至约50%；在超声照射下，肿瘤细胞活力进一步降低，约为15%．以上结果证明CDs@AQ4N具有优异的生物安全性和声动力/乏氧激活化疗疗效，在常氧条件下CDs@AQ4N不会产生毒性，而在肿瘤组织乏氧条件下化疗效果被激活，同时进行SDT，从而实现最佳的协同治疗效果．

2.4 CDs@AQ4N的体内抗肿瘤活性

基于CDs与AQ4N的荧光发射能力，CDs@AQ4N有望用于治疗窗口下的荧光成像引导治疗．如图4(A)所示，对于小鼠双侧4T1肿瘤模型，在其右侧(R)肿瘤中注射CDs@AQ4N，在600 nm波长激发下，右侧肿瘤发出明亮的红色荧光；而左侧(L)肿瘤未注射CDs@AQ4N，则没有观察到荧光，表明CDs@AQ4N具有荧光成像引导肿瘤治疗的潜力．

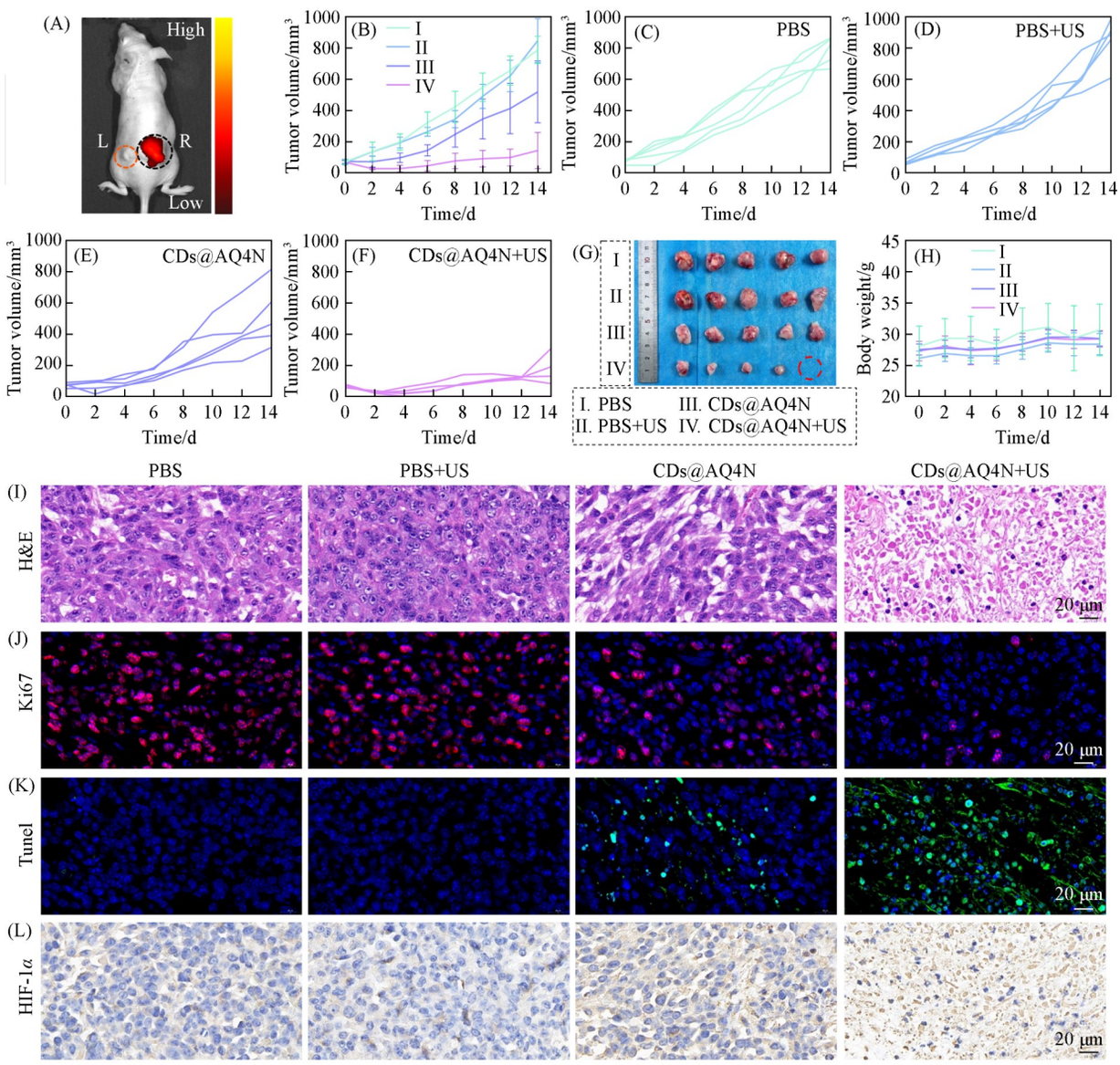


Fig. 4 ***In vivo*** **animal experiments in different treatment groups**

(A) Fluorescence imaging picture of mice after intratumoral injection of CDs@AQ4N(L: left tumor, R: right tumor; E_x=600 nm, E_m=670 nm); (B—F) variation of tumor volume of different treatment groups; (G) photographs of tumors of different treatment groups after the end of treatment(n=5); (H) variation of body weight of mice in different treatment groups; tumor tissue of mice in different treatment groups H&E(I), Ki67(J), TUNEL(K) and HIF-1α(L) section staining images.

实验中评估了CDs@AQ4N在活体小鼠皮下4T1肿瘤模型中SDT与乏氧激活化疗协同治疗的潜力. 当肿瘤体积达到80 mm^3时，20只4T1荷瘤小鼠被随机分为4组：PBS组、PBS+US组、CDs@AQ4N组和CDs@AQ4N+US组，每组5只小鼠，每2天记录一次小鼠的肿瘤体积变化. 如图4(B)~(F)所示，随着时间的延长，PBS组和PBS+US组小鼠的肿瘤迅速增殖，在第14 d时，已生长至约800 mm^3，说明单独的PBS缓冲液与US对肿瘤生长的影响可以忽略不计. 相比之下，CDs@AQ4N组展示出了一定的肿瘤抑制作用，在第14 d时，平均肿瘤体积约为500 mm^3. 而CDs@AQ4N+US组则表现出突出的肿瘤抑制作用，所有小鼠肿瘤的生长均明显受到抑制，平均肿瘤体积为100 mm^3，其中一只小鼠在治疗第4 d时肿瘤完全消除，并且没有观察到复发的情况. 此外，不同治疗组小鼠治疗周期结束后的离体肿瘤组织照片也证实了上述结果[图4(G)]. 在治疗期间，同时监测了小鼠的体重变化，如图4(H)所示，4组小鼠体重维持稳定，表明CDs@AQ4N产生的副作用可忽略不计.

为了进一步评价不同治疗组对肿瘤组织的影响，对治疗后的肿瘤进行了组织学分析，即苏木精&伊红(H&E)、细胞核增殖抗原-67(Ki67)、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)和乏氧因子(HIF-1α)肿瘤组织染色实验. 如图4(I)所示，CDs@AQ4N组的肿瘤组织间隙增加，这是由于AQ4N在乏氧环境下的化疗作用所致，而CDs@AQ4N+US组的表现则更为显著，说明了协同治疗的优势. 当肿瘤组织快速增殖时，细胞核高表达Ki67，发出红色荧光. 如图4(J)所示，PBS组和PBS+US组展示出明显的红色荧光，说明两组的肿瘤增殖没有受限；CDs@AQ4N组的红色荧光减少，说明其肿瘤增殖受到了一定程度的抑制. 值得注意的是，CDs@AQ4N+US组仅观察到极少的红色荧光，说明CDs@AQ4N+US组具有优异的抑制肿瘤增殖作用. 肿瘤组织的TUNEL染色切片则说明了肿瘤的凋亡情况，如图4(K)所示，CDs@AQ4N组的肿瘤表达了一定程度的绿色荧光凋亡信号，而CDs@AQ4N+US组则观察到明显的绿色荧光，再次印证了CDs@AQ4N的声动力疗效. 由于CDs和AQ4N在超声下均能产生$^1O_2$，这进一步消耗了肿瘤内氧气，加剧了肿瘤乏氧，如图4(L)所示，在HIF-1α切片(蓝色代表细胞核，红色代表HIF-1α的表达)中可观察到CDs@AQ4N+US治疗后肿瘤HIF-1α的高表达，表明肿瘤微环境中乏氧程度加剧，这有利于AQ4N药物激活为毒性AQ4化疗药物.

2.5 CDs@AQ4N的生物安全性分析

为了评估CDs@AQ4N的生物安全性，对PBS组和CDs@AQ4N组小鼠的主要器官(心、肝、脾、肺和肾)进行了组织切片分析. 如图5所示，切片染色实验显示小鼠器官均处于正常状态，表明CDs@AQ4N的生物毒性可忽略. 此外，血液分析也是检验生物安全性的重要手段，如图6(A)~(H)所示，小鼠的血常规分析中，白细胞(WBC)、中性粒细胞(Neu)、淋巴细胞(Lym)、单核细胞(Mon)、嗜酸性粒细胞(Eos)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)及血小板(PLT)水平均在正常范围内，说明CDs@AQ4N没有引起小鼠的炎症反应. 小鼠的血液生化(肝肾功能测试)分析结果[图6(I)~(O)]表明，丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、肌酐(CRE)、血尿酸(UA)和尿素氮(BUN)水平同样处于正常范围内，说明CDs@AQ4N对小鼠肝功能的副作用可忽略. 多种血液分析都显示出CDs@AQ4N具有优异的生物相容性.

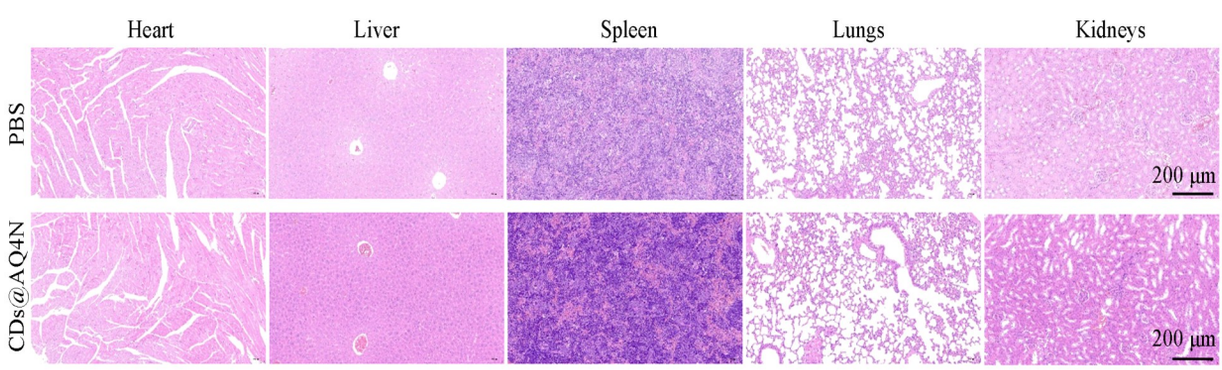


Fig. 5 Photographs of major organ sections

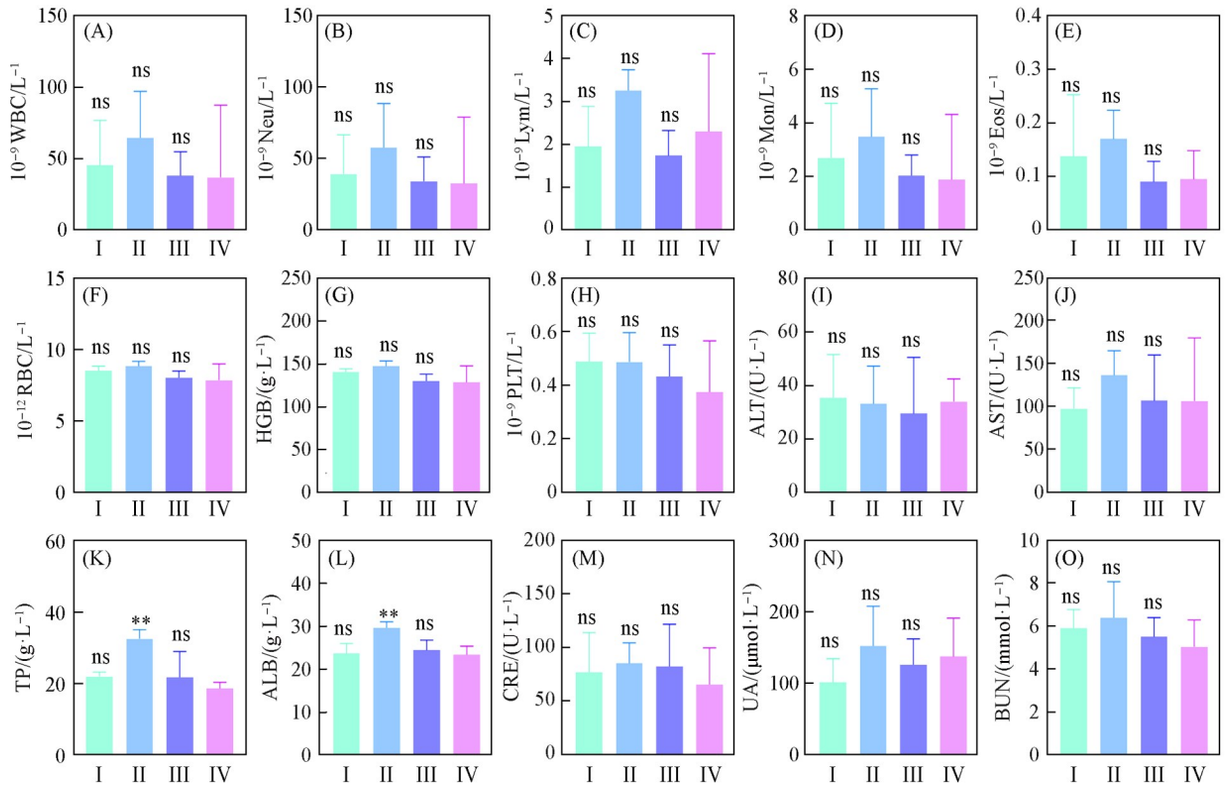


Fig. 6　Biosafety assays for CDs@AQ4N

Routine blood analyses(A—H) and blood biochemical analyses(I—O) of mice from different treatment groups. Significance was determined by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, *p<0.05, **p<0.01, ns stands for no significant difference.

3　结　　论

以还原型谷胱甘肽和甲酰胺为原料合成了一种具有声敏活性的红光发射CDs，并通过静电相互作用、氢键和π-π相互作用，将CDs与乏氧激活化疗药物AQ4N进行组装，制备了CDs@AQ4N纳米药物．其中，AQ4N可在乏氧微环境中被还原为强DNA毒性化合物AQ4，而肿瘤特异性乏氧微环境响应减少了CDs@AQ4N对正常组织的损伤．与单独的CDs或AQ4N相比，CDs@AQ4N在US作用下具有增强的$^1O_2$产生能力．体内外实验结果证实，CDs@AQ4N具有抑制肿瘤增殖、促进肿瘤凋亡的能力，以及优异的生物安全性，可应用于荧光成像引导下的声动力治疗协同乏氧激活化学治疗．

支持信息见http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20240489.

参　考　文　献

[1] Yang F. H., Lv J. Q., Ma W., Yang Y. L., Hu X. M., Yang Z., *Small*, **2024**, *20*(44), 2402669
[2] Zhu P. C., Simon I., Kokalari I., Kohane D. S., Rwei A. Y., *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2024**, *208*, 115275
[3] Xiao H., Li X. X., Li B., Zhong Y., Qin J. Y., Wang Y., Han S. S., Ren J., Shuai X. T., *Acta Biomater.*, **2023**, *161*, 265—274
[4] Xing X. J., Zhao S. J., Xu T., Huang L., Zhang Y., Lan M. H., Lin C. W., Zheng X. L., Wang P. F., *Coord. Chem. Rev.*, **2021**, *445*, 214087
[5] Chen J. J., Zhou Q., Cao W. W., *Adv. Funct. Mater.*, **2024**, *34*(40), 2405844
[6] Lin X. H., Song J. B., Chen X. Y., Yang H. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*(34), 14212—14233
[7] Bathla A., Younis S. A., Kim K. H., Li X. W., *Mater. Horiz.*, **2023**, *10*(5), 1559—1579
[8] Guo Y. T., Li Z. Y., Guo B. C., Wang B, Tu Y. F., *Nano Biomed. Eng.*, **2024**, *16*(2), 135—151
[9] Jiang J. L., Cui X. Y., Huang Y. X., Yan D. M., Wang B. S., Yang Z. Y., Chen M. R., Wang J. H., Zhang Y. N., Liu G., Zhou C., Cui S. S., Ni J., Yang F. H., Cui D. X., *Nano Biomed. Eng.*, **2024**, *16*(2), 152—187

[10] Sharma P., Nangare S., Tade R., Patil P., Bari S., Patil D., *Nano Biomed. Eng.*, **2024**, doi: 10.26599/NBE.2024.9290069
[11] Wang H., Yang S. W., Chen L. F., Li Y. Q., He P., Wang G., Dong H., Ma P. X., Ding G. Q., *Bioact. Mater.*, **2024**, *33*, 174—222
[12] Wang Y. Q., Li X. C., Zhao S. J., Wang B. H., Song X. Z., Xiao J. F., Lan M. H., *Coord. Chem. Rev.*, **2022**, *470*, 214703
[13] Yang Z., Xu T. T., Li H., She M. Y., Chen J., Wang Z. H., Zhang S. Y., Li J. L., *Chem. Rev.*, **2023**, *123*(18), 11047—11136
[14] Ren W. J., Wang H. Q., Chang Q., Li N., Yang J. L., Hu S. L., *Carbon*, **2021**, *184*, 102—108
[15] Yang S. W., Wang X. L., He P., Xu A. L., Wang G., Duan J. L., Shi Y. Q., Ding G. Q., *Small*, **2021**, *17*(10), 2004867
[16] Geng B. J., Hu J. Y., Li Y., Feng S. N., Pang D. Y., Feng L. Y., Shen L. X., *Nat. Commun.*, **2022**, *13*(1), 5735
[17] Jana D., Wang D. D., Rajendran P., Bindra A. K., Guo Y., Liu J. W., Pramanik M., Zhao Y. L., *JACS Au*, **2021**, *1*(12), 2328—2338
[18] Ju Y. Y., Shi X. X., Xu S. Y., Ma X. H., Wei R. J., Hou H., Chu C. C., Sun D., Liu G., Tan Y. Z., *Adv. Sci.*, **2022**, *9*(19), 2105034
[19] Fan C. H., Wu N., Yeh C. K., *Ultrason. Sonochem.*, **2023**, *94*, 106342
[20] Tu L., Liao Z. H., Luo Z., Wu Y. L., Herramann A., Hou S. D., *Exploration*, **2021**, *1*(3), 20210023
[21] Xu H., Yu N., Zhang J. L., Wang Z. J., Geng P., Wen M., Li M. Q., Zhang H. J., Chen Z. G., *Biomaterials*, **2020**, *257*, 120239
[22] Meng Q. X., Wang Q., Zhang Q., Wang J., Li Y. H., Zhu S. Q., Liu R., Zhu H. J., *Mater. Chem. Front.*, **2024**, *8*(5), 1362—1372
[23] Miao X., Yan X. L., Qu D., Li D. B., Tao F. F., Sun Z. C., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9*(22), 18549—18556
[24] Sun T. T., Zheng M., Xie Z. G., Jing X. B., *Mater. Chem. Front.*, **2017**, *1*(2) 354—360
[25] Miao H., Wang L., Zhuo Y., Zhou Z. N., Yang X. M., *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, *86*, 83—89

(Ed.: L, V, K)