

生物工程

钛/铋氧化物纳米材料用于声动力/放射联合治疗肿瘤

郑之裕, 修梦婷, 王 通, 张艳艳, 朱利民*

(东华大学 生物与医学工程学院, 上海 201620)

摘要: 以钛酸四丁酯和冰醋酸为原料, 经水热反应制备了 TiO_2 纳米晶体, 其与 $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ 反应得到 $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒 (BTH), BTH 经聚多巴胺 (PDA) 涂层包覆, 得到了 BTH@PDA 纳米颗粒 (BTP)。通过 TEM、XRD 和 XPS 对 BTP 形貌和组成进行了表征, 采用生物安全性实验、体外细胞毒性测试、体外细胞摄取和活性氧染色测试了 BTP 的生物相容性、细胞毒性和活性氧生成能力。结果表明, BTP 呈梭形, 最长边粒径(125.18 ± 14.66) nm, Zeta 电位为(-4.17 ± 0.33) mV; BTP 悬液在远高于正常治疗质量浓度 ($300 \mu\text{g}/\text{mL}$) 的条件下, 对 L929 细胞和 4T1 细胞无明显的毒性; BTP 能增强放疗的疗效, 在超声和 X 射线共同处理后, 能将 4T1 细胞的存活率降至 34.3%, 并能有效产生活性氧; 4T1 细胞对 BTP 的摄取具有时间依赖性, 在 12 h 时有最大摄取。

关键词: 纳米材料; 金属氧化物; 声动力治疗; 放射治疗; 联合治疗; 生物工程

中图分类号: TB34 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2024) 12-2668-06

Titanium/bismuth oxide nanomaterials for sonodynamic/radiation combined therapy of tumors

ZHENG Zhiyu, XIU Mengting, WANG Tong, ZHANG Yanyan, ZHU Limin*

(College of Biological Science and Medical Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: TiO_2 nanocrystals were synthesized from hydrothermal reaction of tetrabutyl titanate and acetic acid, and then reacted with $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ to prepare $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ nanoparticles (BTH), which was further coated with polydopamine (PDA) to obtain BTH@PDA nanoparticles (BTP). The BTP nanoparticles were characterized by TEM, XRD and XPS for analyses on morphology and composition, and evaluated through biosafety test, cytotoxicity assay, cellular uptake assay and reactive oxygen species (ROS) staining, respectively, on their biosafety, biocompatibility and the ability of ROS generation. The results indicated that BTP exhibited a fusiform shape, with the longest side having a particle size of (125.18 ± 14.66) nm, and a Zeta potential of (-4.17 ± 0.33) mV. BTP suspension showed no obvious toxicity towards L929 and 4T1 cells at a mass concentration significantly above normal treatment concentration ($300 \mu\text{g}/\text{mL}$). Meanwhile, BTP could enhance the therapeutic outcome of radiotherapy and effectively generate ROS in response to ultrasound. After co-treatment by ultrasound and X ray, BTP could reduce the survival rate of 4T1 cells to 34.3%. The cellular uptake of BTP by 4T1 cells was time-dependent, with the maximum uptake occurring around 12 h.

Key words: nanomaterials; metal oxides; sonodynamic therapy; radiation therapy; combined therapy; biological engineering

放疗是一种传统的癌症治疗方法, 与化疗^[1-2]和手术^[3-4]一起作为主流的治疗方法, 在临床得到了广泛的应用。然而, 肿瘤组织对放射线的吸收效率

不高^[5], 并且不同类型的肿瘤对于放射线的敏感性存在显著差异, 严重影响放疗效果^[6]。研究表明, 高原子序数元素可以通过光电效应和康普顿效应来

收稿日期: 2023-12-11; 定用日期: 2024-02-07; DOI: 10.13550/j.jxhg.20231064

基金项目: 上海市科学技术委员会资助项目 (22520710400, 21WZ2501300 和 20DZ2254900); 教育部生物医药纺织材料“111 项目”(B07024)

作者简介: 郑之裕 (1997—), 男, 硕士生, E-mail: zh1yuz@163.com. 联系人: 朱利民 (1960—), 男, 教授, E-mail: lzhu@dhu.edu.cn.

沉积 X 射线的能量, 并产生更多的光电子和俄歇电子等二次电子来损伤癌细胞^[7-8]。为了满足肿瘤组织对于营养物质和氧气的旺盛需求, 实体瘤内部的血管结构致密且弯曲, 然而这些血管往往存在结构和功能异常, 包括基底膜缺乏以及血管内皮不完整等, 这种特点令增强渗透和滞留(EPR)效应得以发生^[9]。此外, 还有研究表明, 粒径在 100~200 nm 的纳米颗粒可以通过 EPR 效应进入并富集于肿瘤部位, 并且椭球状、圆柱状、盘状等形状的颗粒在肿瘤部位的积累效果更好^[10]。因此, 构建一种能够富集在肿瘤部位并且能增强放射线对肿瘤损伤的新型纳米材料将是提升放疗效果的有效方法。

与近红外光相比, 超声具有更强的组织穿透能力, 能够作用于组织深处的肿瘤。近年来, 声动力治疗作为一种由超声介导的非侵入性疗法受到了人们越来越多的关注。一些小分子声敏剂, 如原卟啉^[11-12]、吡啶菁绿^[13-14]、二氢卟吩 e6^[15]等可以在超声辐照的条件下产生活性氧(ROS), 从而损伤肿瘤细胞。然而, 小分子声敏剂往往存在光毒性和暗毒性的问题, 在杀伤肿瘤细胞的同时, 也会对正常组织产生毒害。针对上述问题, 有学者发现, 超声辐照可以引发钛氧化物发生电子-空穴分离, 能够在水介质中产生 ROS, 曾被广泛用于光催化领域的钛氧化物^[16]材料开始被研究人员重视, 并被广泛应用于癌症的声动力治疗^[17-18]。

为了增强放疗效果, 并与声动力治疗相结合, 本文拟使用二氧化钛(TiO_2)为核心以响应超声产生 ROS, 并在其表面沉积氧化铋(Bi_2O_3), 铋自身高原子序数元素的特点使其具备增强放射损伤的功能, 制备了具有适当粒径的纳米材料, 使其可以通过 EPR 效应被动靶向至实体瘤, 再通过多巴胺在弱碱性环境下的氧化自聚合行为, 在纳米平台的表面涂覆一层聚多巴胺(PDA), 以提高其在生理环境中的稳定性与安全性。通过透射电子显微镜(TEM)、X 射线衍射仪(XRD)、X 射线光电子能谱仪(XPS)等表征纳米平台, 并评估其对正常细胞的安全性以及对肿瘤细胞的杀伤能力。以期为增强放疗效果纳米材料的制备和声动力治疗的应用提供参考。

1 实验部分

1.1 试剂、材料与仪器

钛酸四丁酯(TBT)、冰醋酸、浓硝酸(质量分数 68.0%)、尿素、无水乙醇, AR, 国药集团化学试剂有限公司; $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, AR, 上海易恩化学技术有限公司; 盐酸多巴胺, AR, 阿拉丁试剂(上海)

有限公司; 盐酸阿霉素($\text{HCl}\cdot\text{DOX}$), AR, 上海迈瑞尔化学技术有限公司; Tris-HCl 缓冲液($\text{pH}=8.5$), 上海麦克林生化科技股份有限公司; RPMI 1640 培养基、DMEM 高糖培养基, 美国 Cytiva 公司; 磷酸盐缓冲液(PBS, $\text{pH}=7.4$)、青霉素-链霉素双抗溶液、胰蛋白酶(含酚红)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液、2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)试剂盒、多聚甲醛组织固定液(质量浓度 40 g/L), 北京兰杰柯科技有限公司; 胎牛血清(FBS), 美国 Merck 公司; Calcein-AM/PI 试剂盒, 上海贝博生物科技有限公司; L929 细胞和 4T1 细胞, 赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。

JEM-2100 型透射电子显微镜(TEM), 日本 JEOL; Zetasizer Nano ZS90 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 英国 Malvern 公司; D8 Avance 型 X 射线衍射仪(XRD), 德国 Bruker 公司; EscaLab 250Xi 型 X 射线光电子能谱仪(XPS)、Multiskan FC 型酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; WED-100 型超声理疗仪, 深圳市威尔德医疗电子有限公司; FV1000 型激光共聚焦扫描电子显微镜(CLSM), 日本 Olympus 公司; DMi8 型倒置荧光显微镜, 德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 TiO_2 纳米晶体制备

参考文献[19]方法制备 TiO_2 纳米晶体。在 30 mL 冰醋酸中加入 2 mL 的 TBT, 并在搅拌下迅速加入 1 mL 去离子水, 室温下搅拌 10 min 后移入带有聚四氟乙烯内衬的水热釜中密封, 然后将水热釜置于马弗炉中 150 °C 加热 12 h。反应结束后, 待水热釜冷却至室温, 将反应混合物离心 10 min (13000 r/min), 所得固体沉淀用去离子水和无水乙醇分别洗涤 3 次, 得到 344.8 mg 白色 TiO_2 纳米晶体。

1.2.2 $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒制备

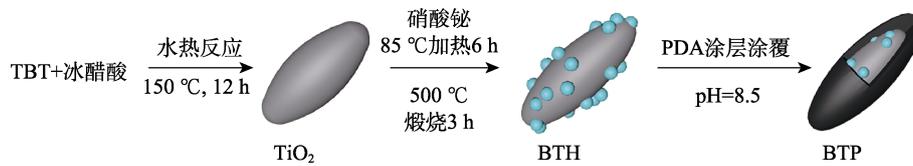
称取 TiO_2 纳米晶体 100 mg 分散在 50 mL 去离子水中得到 TiO_2 悬液, 接着在 TiO_2 悬液中加入 10 μL 浓硝酸和 73 mg 的 $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, 搅拌使其完全溶解。再向上述体系中加入 1.2 g 尿素, 升温至 85 °C 加热 6 h。待反应体系冷却至室温后, 离心收集, 得到白色沉淀, 用去离子水和无水乙醇分别洗涤 3 次后, 在 60 °C 烘箱中干燥 12 h。最后将所得产物在 500 °C 下煅烧 3 h, 得到 117.4 mg 的 $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒, 记为 BTH。

1.2.3 PDA 涂层涂覆

首先, 称取 4 mg 盐酸多巴胺溶于 Tris-HCl 缓冲液($\text{pH}=8.5$)中, 配成质量浓度为 0.2 g/L 的溶液, 记为溶液 A。称取 30 mg 的 BTH 溶于 30 mL 的 Tris-HCl 缓冲液($\text{pH}=8.5$)中, 记为溶液 B。然后, 将 20

mL 溶液 A 以 10 mL/h 的速率滴加至溶液 B 中, 并避光搅拌 6 h。最后, 经离心收集沉淀产物, 并用去离子

水洗涤 3 次, $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥 24 h 后, 得到 BTH@PDA 纳米颗粒, 记为 BTP。其制备过程如下所示。



1.3 表征与测试

通过 TEM 观察 TiO_2 纳米晶体、BTH 和 BTP 的微观形貌, 通过 Image J 进行粒径统计, 测试工作电压 200 kV。使用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定材料的 Zeta 电位和粒径分布。XRD 测试: 靶材 $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=0.1541\text{ nm}$), 管电压 40 V, 管电流 40 mA, 扫描速率 $8\text{ }(^{\circ})/\text{min}$, 扫描范围 $2\theta=3^{\circ}\sim 90^{\circ}$ 。通过 XPS 分析材料的元素组成, $\text{Al K}\alpha$ 为射线源, 并以 C 1s (284.8 eV) 为基准对数据进行校正。

1.4 体外细胞毒性测试

使用 CCK-8 法测定不同材料以及不同治疗方法对 4T1 细胞的毒性。首先, 将 4T1 细胞以 1×10^4 个/孔的细胞密度接种于 96 孔细胞培养板中, 使用 RPMI1640 培养基培养 24 h。将 BTP 溶于 RPMI1640 培养基, 配成不同质量浓度 ($0, 3.125, 6.250, 12.500, 25.000, 50.000\text{ }\mu\text{g/mL}$) 的悬液, 待用。根据 CCK-8 试剂盒说明书, 使用 RPMI1640 培养基稀释 CCK-8 原液, 配制成体积分数 10% 的 CCK-8 工作液。

根据不同处理方法, 将各实验组设置为: 材料处理组 (仅有不同质量浓度的 BTP 培养基悬液)、超声处理组 (不同质量浓度的 BTP 培养基悬液+超声辐照)、放射处理组 (不同质量浓度的 BTP 培养基悬液+X 射线辐照); 共同处理组 (不同质量浓度的 BTP 培养基悬液+超声辐照+X 射线辐照)。对于材料处理组, 首先吸弃旧培养基, 向每孔中分别加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 不同质量浓度的 BTP 悬液共孵育 24 h 后, 除去旧培养基, 在每孔内加入 $110\text{ }\mu\text{L}$ 的 CCK-8 工作液, 避光孵育 45 min 后使用酶标仪测定溶液的吸光度并根据公式 (1) 计算细胞的存活率; 对于超声处理组, 吸弃旧培养基并向每孔中分别加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 不同质量浓度的 BTP 悬液共孵育 16 h 后, 对细胞进行超声处理 (1 MHz , 2 W/cm^2 , 占空比 40%, 3 min), 继续孵育 8 h, 随后除去旧培养基, 在每孔内加入 $110\text{ }\mu\text{L}$ 的 CCK-8 工作液, 避光孵育 45 min 后使用酶标仪测定溶液的吸光度并根据公式 (1) 计算细胞存活率; 对于放射处理组, 吸弃旧培养基并向每孔中分别加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 不同质量浓度的 BTP 悬液共孵育 16 h 后, 对细胞进行 X 射线照射, 放射剂量为 4 Gy, 继续培养 8 h, 随后除去旧培养基, 在每孔内

加入 $110\text{ }\mu\text{L}$ 的 CCK-8 工作液, 避光孵育 45 min 后使用酶标仪测定溶液的吸光度并根据公式 (1) 计算细胞存活率; 对于共同处理组, 吸弃旧培养基并向每孔中分别加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 不同质量浓度的 BTP 悬液共孵育 16 h 后, 先对其进行剂量为 4 Gy 的 X 射线照射, 随后立即进行超声处理 (1 MHz , 2 W/cm^2 , 占空比 40%, 3 min), 继续培养 8 h 后, 随后吸弃旧培养基, 在每孔内加入 $110\text{ }\mu\text{L}$ 的 CCK-8 工作液, 避光孵育 45 min 后使用酶标仪测定溶液的吸光度并根据公式 (1) 计算细胞存活率^[20]。各组设置为: 实验组 (材料处理组、超声处理组、放射处理组和共同处理组)、对照组 (使用不含材料的培养基培养细胞且不施加任何处理, 后用 CCK-8 工作液与细胞共孵育) 和空白组 (仅有 CCK-8 工作液)。

$$\text{细胞存活率}/\% = (A_1 - A_0)/(A_2 - A_0) \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 、 A_1 、 A_2 分别代表空白组、实验组、对照组的吸光度。

1.5 生物安全性测试

选用 L929 细胞和 4T1 细胞为模型细胞, 测试材料对于正常细胞和肿瘤细胞的毒性。将 L929 细胞和 4T1 细胞以 1×10^4 个/孔的细胞密度接种于 96 孔细胞培养板中。L929 细胞与 4T1 细胞分别使用含有双抗 (青霉素, 100 U/mL ; 链霉素, 100 g/L) 的 DMEM 高糖培养基与 RPMI1640 培养基在恒温培养箱 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, CO_2 体积分数 5%) 中培养 24 h 后, 吸弃旧培养基, 每孔分别加入预先配制的不同质量浓度 ($50, 100, 150, 200, 300\text{ }\mu\text{g/mL}$) 的 BTP 培养基悬液 $200\text{ }\mu\text{L}$ (用于 L929 细胞的 BTP 悬液用 DMEM 高糖培养基配制, 用于 4T1 细胞的 BTP 悬液用 RPMI1640 培养基配制), 继续孵育 24 h。最后去除旧培养基, 每孔加入 CCK-8 工作液 $110\text{ }\mu\text{L}$, 避光孵育 45 min, 使用酶标仪测定实验组、对照组和空白组的吸光度, 并按公式 (1) 计算细胞存活率。各组设置为: 实验组 (在使用含有 BTP 的培养基悬液培养后用 CCK-8 工作液与细胞共孵育)、对照组 (使用不含材料的培养基培养细胞后用 CCK-8 工作液与细胞共孵育) 和空白组 (仅有 CCK-8 工作液)。

1.6 体外细胞摄取测试

使用常见化疗药物 DOX 作为荧光标记。DOX

在受到波长为 490 nm 的激光激发时, 在 550 nm 处能够发出最大荧光。由于 PDA 涂层表面带负电, 与 DOX 电性相反, 因此, 可以通过静电吸附的方式将 DOX 负载在 BTP 纳米颗粒表面。具体步骤为: 各取 2 mg 的 BTP 与 HCl·DOX 共溶于 5 mL 去离子水中, 避光搅拌 24 h 后, 以 13000 r/min 的转速离心分离, 去除未负载的游离 DOX, 随后用去离子水洗涤沉淀, 并在 -45 °C 冷冻 24 h, 得到 BTP-DOX。将 BTP-DOX 溶于 RPMI1640 培养基, 配成质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BTP-DOX 悬液。

首先, 将 4T1 细胞以 1×10^5 个/孔的细胞密度接种于玻底培养皿上, 在恒温 (37 °C, CO_2 体积分数 5%) 培养箱中培养 24 h, 随后吸弃旧培养液, 加入 2 mL 的 BTP-DOX 悬液共孵育不同时间 (0、4、12、24 h) 后, 除去含有材料的培养液并用 PBS 洗涤 2 次, 之后使用多聚甲醛组织固定液避光固定细胞 15 min, 然后加入 500 μL 质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DAPI 染液, 避光孵育 5 min 后用 PBS 洗涤 2 次。最后使用 CLSM 观察细胞内 DOX 的荧光强弱。

1.7 ROS 染色测试

以 1×10^5 个/孔的细胞密度将 4T1 细胞接种在 6 孔细胞培养板上, 并在 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h。将细胞分为 4 组 (对照组、BTP 组、超声组和 BTP+超声组), 首先, 在除去旧培养基后, 每孔内加入 1 mL 对应的新培养基 (对照组与超声组为 RPMI1640 培养基, BTP 组与 BTP+超声组为 RPMI1640 培养基配制的质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BTP 培养基悬液) 培养 16 h 后, 除去培养液, 用 PBS 洗涤细胞 2 次。根据 DCFH-DA 试剂盒说明书, 用无血清培养基稀释 DCFH-DA 原液, 配成浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的工作液。对照组与 BTP 组在每孔内加入工作液 1 mL, 在培养箱 (37 °C, CO_2 体积分数 5%) 中避光孵育 30 min。超声组与 BTP+超声组在加入工作液 1 mL 后先避光孵育 10 min, 随后施加超声 (1 MHz, 2 W/cm^2 , 占空比 40%, 3 min), 接着再避光孵育 20 min。最后除去工作液, 用无血清培养基润洗细胞 2 次, 使用倒置荧光显微镜观察各组细胞的荧光。

2 结果与讨论

2.1 表征结果分析

图 1 为 TiO_2 纳米晶体、BTH 和 BTP 的 TEM 图及粒径分布图。

从图 1a~d 可以看出, 所制备的 TiO_2 纳米晶体呈梭形, 粒径为 (89.09 ± 14.00) nm (按照最长边计算); 负载 Bi_2O_3 后, BTH 粒径为 (106.55 ± 15.51) nm; 包覆 PDA 涂层后, BTP 表面可见一层明显的薄膜,

厚度约为 9 nm, 整体粒径增大为 (125.18 ± 14.66) nm, 表明 PDA 成功包覆 BTH。Zeta 电位测定结果显示, BTH 的表面 Zeta 电位为 (18.60 ± 0.33) mV, 而包覆 PDA 涂层后 BTP 的表面 Zeta 电位为 (-4.17 ± 0.33) mV, 这是因为, PDA 含有大量的羟基, 导致 BTP 的 Zeta 电位从正值 (BTH) 变为负值。

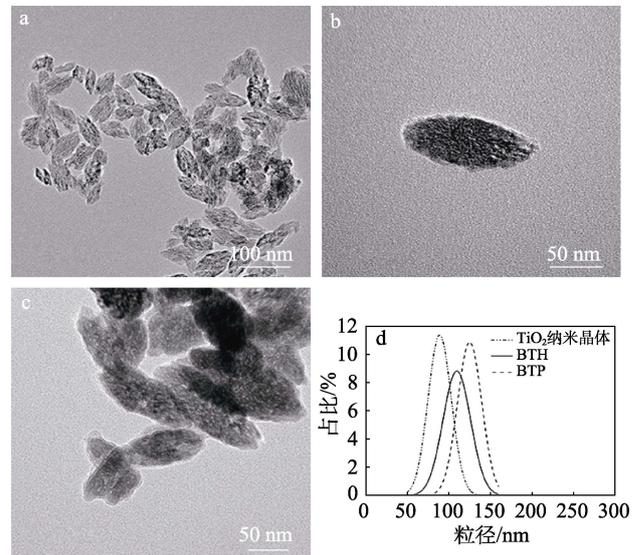


图 1 TiO_2 纳米晶体 (a)、BTH (b)、BTP (c) 的 TEM 图及其粒径分布图 (d)

Fig. 1 TEM images of TiO_2 (a), BTH (b) and BTP (c) and their size distribution curves (d)

图 2 为 BTH 的 XRD 谱图。可以看出, BTH 由 Bi_2O_3 (Bi_2O_3 : PDF#76-2478) 与锐钛矿型的 TiO_2 (TiO_2 : PDF#21-1272) 组成, $2\theta=25.3^\circ$ 、 37.8° 和 48.0° 的衍射峰分别属于 TiO_2 的 (101)、(004) 和 (200) 晶面, $2\theta=28.3^\circ$ 、 47.1° 和 55.9° 的衍射峰则属于 Bi_2O_3 的 (111)、(220) 和 (311) 晶面。

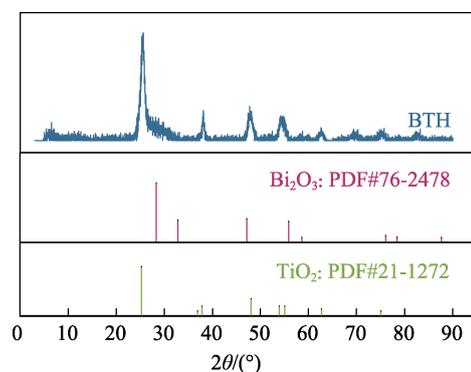
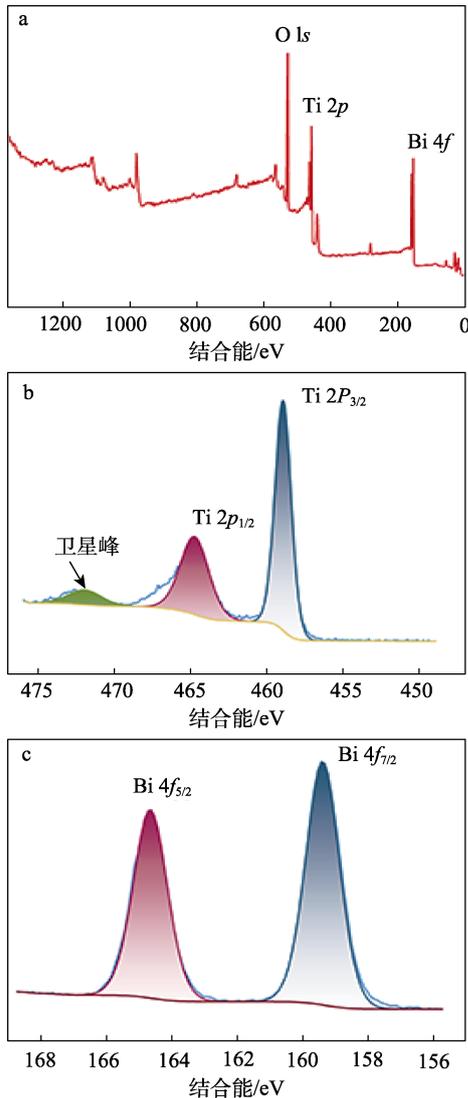


图 2 BTH 的 XRD 谱图

Fig. 2 XRD pattern of BTH

图 3 为 BTH 的 XPS 谱图。可以看出, BTH 表面分布着 O、Ti 和 Bi 元素; Ti 2p 在结合能 458.7 和 464.6 eV 处峰分别属于 $\text{Ti } 2p_{3/2}$ 和 $\text{Ti } 2p_{1/2}$; Bi 4f 在结合能 159.4 和 164.6 eV 处峰分别属于 $\text{Bi } 4f_{7/2}$

和 Bi 4f_{5/2}, 证明 Ti⁴⁺与 Bi³⁺的存在, 与文献^[21-22]结果一致。



a—XPS 全谱; b—Ti 2p 高分辨 XPS 谱图; c—Bi 4f 高分辨 XPS 谱图
图 3 BTH 的 XPS 谱图
Fig. 3 XPS spectra of BTH

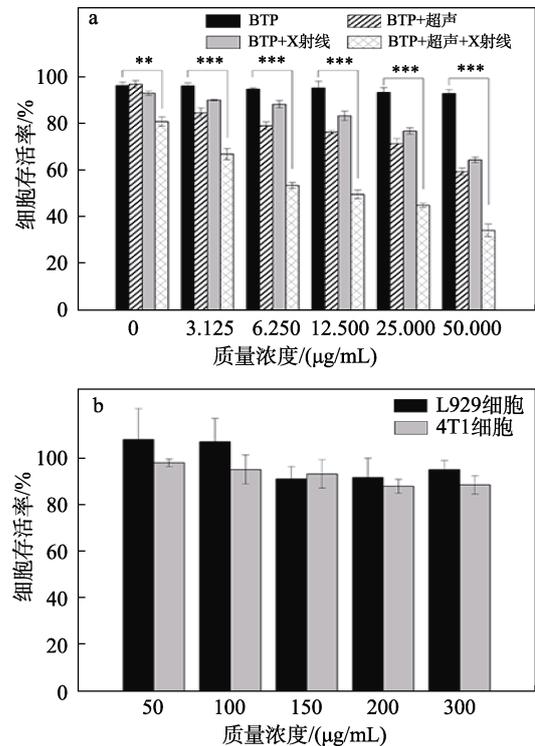
2.2 体外细胞毒性分析

图 4a 为 BTP 的体外细胞毒性测试结果。可以看出, 在未经超声和 X 射线辐照的条件下, 不同质量浓度的 BTP 均未明显影响 4T1 细胞的存活; 而经过超声处理或 X 射线照射的细胞, 细胞存活率分别下降至 59.6%与 64.7%; 同时接受两种处理(超声和 X 射线照射)的 4T1 细胞, 其细胞的存活率降至 34.3%, 与 BTP 单独处理组有极显著性差异 ($P < 0.005$), 证明了声动力/放射联合治疗的策略是有效的。

2.3 生物安全性分析

图 4b 为 BTP 的生物安全性测试结果。可以看出, 即使是在远高于正常治疗质量浓度的条件下 (300 $\mu\text{g/mL}$), BTP 都没有对 L929 细胞和 4T1 细胞显示出明显的毒性, 细胞存活率仍能达到 95.2%

(L929 细胞) 与 88.6% (4T1 细胞), 表明 BTP 具有良好的生物安全性。



“**”代表差异显著 ($P < 0.05$), “***”代表差异极显著 ($P < 0.005$)
图 4 BTP 的细胞毒性 (a) 与生物安全性测试 (b)
Fig. 4 Cell toxicity (a) and biosafety assay (b) of BTP

2.4 细胞摄取结果分析

图 5 为 BTP-DOX 在不同时间下细胞摄取的 CLSM 图。可以看出, 在 0~12 h 内细胞的红色荧光 (DOX 标记的 BTP) 逐渐变强, 之后 (12~24 h) 则慢慢减弱; 而细胞的蓝色荧光 (DAPI 染液染色的 4T1 细胞的细胞核) 未发生明显变化, 说明 4T1 细胞对 BTP 颗粒的摄取具有时间依赖性, 并且在 12 h 时有最大摄取。

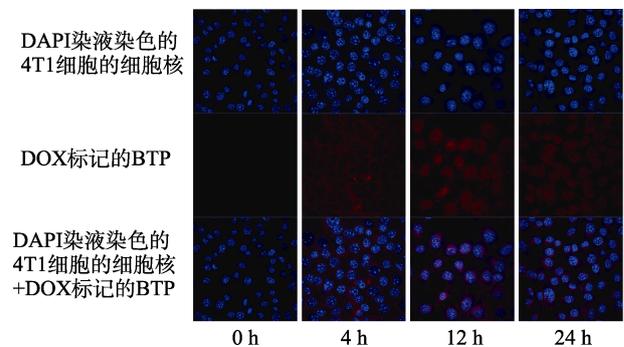


图 5 BTP-DOX 在不同时间的摄取情况
Fig. 5 Cellular uptake of BTP-DOX at different times

2.5 ROS 染色结果分析

ROS 探针 DCFH-DA 是一种可以渗透细胞膜的小分子, 在进入细胞后, 会被细胞内的酯酶分解为

本身不带荧光的 DCFH 而失去透过细胞膜的能力, 并滞留在细胞内, 易被 ROS 氧化为带有荧光的 2',7'-二氯荧光素, 荧光的强弱可以反映所产生的 ROS 的量。图 6 为不同处理组的细胞内 ROS 产生情况。

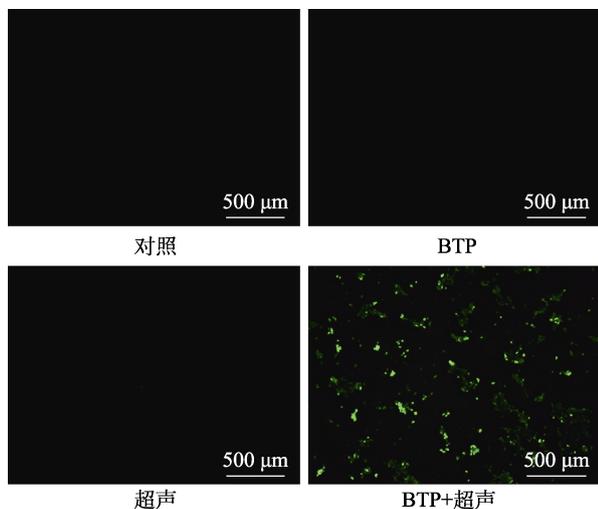


图 6 不同处理组的细胞内 ROS 产生情况

Fig. 6 Intracellular reactive oxygen species production in different treatment groups

从图 6 可以看出, 只有 BTP+超声组观察到绿色荧光, 而在对照组、BTP 组和超声组中未观察到绿色荧光, 表明体系中的 ROS 主要来自于 BTP 材料对超声的响应行为, 说明 BTP 材料本身在未受到超声辐照的情况下, 并不能诱导 ROS 的产生。

3 结论

以 TBT 和冰醋酸为原料, 经水热反应制备了 TiO₂ 纳米晶体, 再与 Bi(NO₃)₃ 反应得到 Bi₂O₃/TiO₂ 纳米颗粒 (BTH), 最后经 PDA 涂层包覆, 得到 BTH@PDA 纳米颗粒 (BTP)。BTP 呈梭形, 最长边粒径为 (125.18±14.66) nm, Zeta 电位为 (-4.17±0.33) mV。BTP 悬液在远高于正常治疗质量浓度的条件下 (300 μg/mL), 对 L929 细胞和 4T1 细胞无明显毒性。BTP 能够增强放疗的疗效, 在超声和 X 射线共同处理后, 4T1 细胞的存活率为 34.3%, 并能有效产生 ROS。4T1 细胞对 BTP 颗粒的摄取具有时间依赖性, 并且在 12 h 时有最大摄取。

BTP 表面的 PDA 涂层在增强生物安全性的同时, 其良好的黏附性也为负载更多化疗药物、光敏剂或靶向分子等提供了可能, 作为联合治疗的纳米平台, 具有进一步研究的价值。

参考文献:

[1] QIN S Y, ZHANG A Q, ZHANG X Z. Recent advances in targeted tumor chemotherapy based on smart nanomedicines[J]. *Small*, 2018, 14(45): 1802417.
[2] WEI G Q, WANG Y, YANG G, *et al.* Recent progress in nanomedicine

for enhanced cancer chemotherapy[J]. *Theranostics*, 2021, 11(13): 6370-6392.
[3] DAI J, XUE H Y, CHEN D G, *et al.* Aggregation-induced emission luminogens for assisted cancer surgery[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 464: 214552.
[4] WANG C, FAN W P, ZHANG Z J, *et al.* Advanced nanotechnology leading the way to multimodal imaging-guided precision surgical therapy[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(49): 1904329.
[5] SONG G S, CHENG L, CHAO Y, *et al.* Emerging nanotechnology and advanced materials for cancer radiation therapy[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(32): 1700996.
[6] BARKER H E, PAGET J T E, KHAN A A, *et al.* The tumour microenvironment after radiotherapy: Mechanisms of resistance and recurrence[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2015, 15(7): 409-425.
[7] BULIN A L, BROEKGAARDEN M, CHAPUT F, *et al.* Radiation dose-enhancement is a potent radiotherapeutic effect of rare-earth composite nanoscintillators in preclinical models of glioblastoma[J]. *Advanced Science*, 2020, 7(20): 2001675.
[8] ZANG Y, GONG L J, MEI L Q, *et al.* Bi₂WO₆ semiconductor nanoplates for tumor radiosensitization through high-Z effects and radiocatalysis[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(21): 18942-18952.
[9] WU J. The enhanced permeability and retention (EPR) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application[J]. *Journal of Personalized Medicine*, 2021, 11(8): 771.
[10] BLANCO E, SHEN H, FERRARI M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(9): 941-951.
[11] ZHU P, CHEN Y, SHI J L. Nanoenzyme-augmented cancer sonodynamic therapy by catalytic tumor oxygenation[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(4): 3780-3795.
[12] SONG K, CHEN G B, HE Z Y, *et al.* Protoporphyrin-sensitized degradable bismuth nanoformulations for enhanced sonodynamic oncotherapy[J]. *Acta Biomaterialia*, 2023, 158: 637-648.
[13] CAO T G N, KANG J H, YOU J Y, *et al.* Safe and targeted sonodynamic cancer therapy using biocompatible exosome-based nanosensitizers[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(22): 25575-25588.
[14] WU T T, LIU Y, CAO Y, *et al.* Engineering macrophage exosome disguised biodegradable nanoplateform for enhanced sonodynamic therapy of glioblastoma[J]. *Advanced Materials*, 2022, 34(15): 2110364.
[15] LEE H R, KIM D W, JONES V O, *et al.* Sonosensitizer-functionalized graphene nanoribbons for adhesion blocking and sonodynamic ablation of ovarian cancer spheroids[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, 10(13): 2001368.
[16] LI N (李宁), ZHANG W (张伟), LI G X (李贵贤), *et al.* Research progress of TiO₂ photocatalysts[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(11): 2181-2258.
[17] LUO J L, CAO J, MA G R, *et al.* Collagenase-loaded H-TiO₂ nanoparticles enhance ultrasound imaging-guided sonodynamic therapy in a pancreatic carcinoma xenograft model *via* digesting stromal barriers[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(36): 40535-40545.
[18] HARADA A, ONO M, YUBA E, *et al.* Titanium dioxide nanoparticle-entrapped polyion complex micelles generate singlet oxygen in the cells by ultrasound irradiation for sonodynamic therapy[J]. *Biomaterials Science*, 2013, 1(1): 65-73.
[19] HE Y, WAN J Y, YANG Y, *et al.* Multifunctional polypyrrole-coated mesoporous TiO₂ nanocomposites for photothermal, sonodynamic, and chemotherapeutic treatments and dual-modal ultrasound/photoacoustic imaging of tumors[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2019, 8(9): 1801254.
[20] JIANG R T, LI J Q, LI L H, *et al.* Engineering near-infrared plasmonic spiky gold nanostructures for highly efficient surface-enhanced Raman spectroscopy-guided cancer hyperthermia therapy [J]. *Advanced Functional Materials*, 2024, 34(1): 2307631.
[21] GONBEAU D, GUIMON C, PFISTER-GUILLOUZO G, *et al.* XPS study of thin films of titanium oxysulfides[J]. *Surface Science*, 1991, 254(1): 81-89.
[22] MORGAN W E, STEC W J, VAN WAZER J R. Inner-orbital binding-energy shifts of antimony and bismuth compounds[J]. *Inorganic Chemistry*, 1973, 12(4): 953-955.