

Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA 复合纳米平台加强肿瘤化学动力学的可行性

王振鑫¹, 周鹏², 褚福超¹, 张大振¹, 袁峰³

https://doi.org/10.12307/2024.530

投稿日期: 2023-09-22

采用日期: 2023-11-04

修回日期: 2023-11-16

在线日期: 2023-11-27

中图分类号:

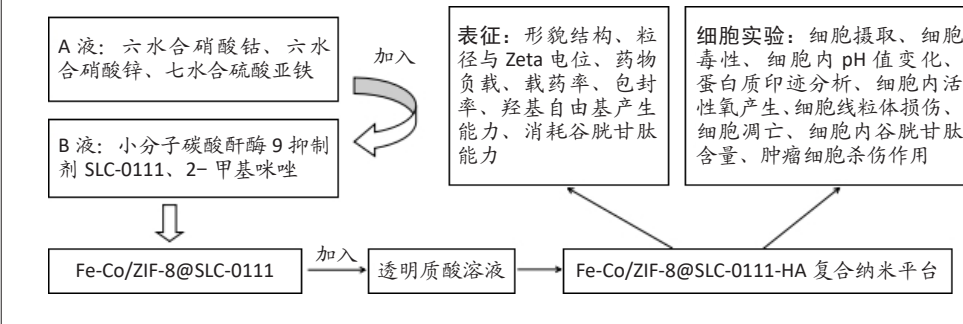
R459.9; R318.08; R73-36

文章编号:

2095-4344(2024)29-04612-08

文献标识码: A

文章快速阅读: Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA 复合纳米平台加强肿瘤化学动力学的疗效



文题释义:

化学动力学疗法: 使用过渡金属纳米材料作为催化剂, 利用过氧化氢催化芬顿或类芬顿反应发生, 产生剧毒羟基自由基($\cdot\text{OH}$), 从而达到杀伤肿瘤目的的一种新型肿瘤治疗策略。

小分子 SLC-0111: 是一种新型碳酸酐酶9抑制剂, 可以促进肿瘤细胞胞内质子堆积, 并且将 pH 值维持在芬顿或类芬顿反应合适的阈值范围内, 使过渡金属离子可以发挥其最大催化效能, 促进更多 $\cdot\text{OH}$ 的生成, 用于加强化学动力学疗法的疗效。

摘要

背景: 常用金属离子的低催化活性与缺乏靶向性等问题严重限制了化学动力学疗法在肿瘤治疗中的应用。另外, 虽然通过对复合纳米平台进行表面功能化来赋予其靶向肿瘤的功能, 但是肿瘤细胞内酸性不足也严重削弱了化学动力学疗法的疗效。

目的: 制备新型复合纳米平台, 评估其在细胞水平上增强化学动力学疗法的可行性。

方法: 通过离子交换反应和自组装作用合成了掺杂二价铁离子和二价钴离子的载 SLC-0111(一种碳酸酐酶9抑制剂)沸石咪唑骨架-8(Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111), 并在表面加载透明质酸, 得到目标纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA(记为FC-S), 同时合成不载 SLC-0111的纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8-HA(记为FC)。测试FC-S的粒径、Zeta 电位、表面形貌、体外活性氧产生、消耗谷胱甘肽的能力。分别以人骨肉瘤细胞 MG-63 和小鼠成纤维细胞 L929 为实验对象, 采用 CCK-8 法检测 FC-S 的细胞毒性。以人骨肉瘤细胞 MG-63 为实验对象, 检测 FC-S 的细胞内化; 在加入 H_2O_2 的情况下, FC-S、FC 对细胞内 pH 值、碳酸酐酶9蛋白表达、细胞活性与凋亡、细胞内活性氧与谷胱甘肽含量、细胞线粒体膜电位的影响。

结果与结论: ①FC-S 具有菱形十二面体结构, 尺寸均匀, 分散良好, 平均粒径为 323 nm, Zeta 电位约为 -11.1 mV, 体外可产生活性氧并消耗谷胱甘肽。②FC-S 以时间依赖的方式在 MG-63 细胞内累积, 并且能成功从溶酶体中逃逸。当 FC-S 质量浓度 $\leq 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 MG-63 细胞与 L929 细胞无明显的细胞毒性, 后续实验选择 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ FC-S 作用于 MG-63 细胞。③与 FC 组比较, FC-S 组 MG-63 细胞内碳酸酐酶9蛋白表达降低 ($P < 0.01$)、细胞内酸性环境增强、细胞内活性氧含量增加 ($P < 0.001$)、细胞线粒体损伤加重、死细胞数量增加、细胞凋亡率升高 ($P < 0.001$)。④结果表明, FC-S 复合纳米平台能够有效改善肿瘤细胞内弱酸性微环境、提升胞内活性氧产生水平, 增强化学动力学疗法的疗效。

关键词: 纳米平台; 化学动力学疗法; 碳酸酐酶9; 碳酸酐酶9抑制剂; 活性氧; 细胞凋亡

Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA composite nanoplateform enhances feasibility of tumor chemodynamic therapy

Wang Zhenxin¹, Zhou Peng², Chu Fuchao¹, Zhang Dazhen¹, Yuan Feng³

¹First Clinical Medical College of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221006, Jiangsu Province, China; ²Department of Orthopedics, Affiliated Huai'an Hospital of Xuzhou Medical University, Huai'an Second People's Hospital, Huai'an 223002, Jiangsu Province, China; ³Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221006, Jiangsu Province, China

Wang Zhenxin, Master candidate, First Clinical Medical College of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221006, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Yuan Feng, Professor, MD, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221006, Jiangsu Province, China

¹徐州医科大学第一临床医学院, 江苏省徐州市 221006; ²徐州医科大学附属医院淮安医院, 淮安市第二人民医院骨科, 江苏省淮安市 223002;

³徐州医科大学附属医院骨科, 江苏省徐州市 221006

第一作者: 王振鑫, 男, 1998年生, 江苏省宿迁市人, 汉族, 徐州医科大学在读硕士, 主要从事纳米材料及骨科基础与临床研究。

通讯作者: 袁峰, 教授, 博士, 徐州医科大学附属医院骨科, 江苏省徐州市 221006

https://orcid.org/0009-0002-0518-7719(王振鑫)

基金资助: 江苏省卫健委重点项目(ZD2022064), 项目负责人: 袁峰; 江苏省中医药科技发展计划项目(MS2021102), 项目负责人: 袁峰; 骨组织再生与数字技术重点实验室建设项目(PT0306), 项目负责人: 袁峰; 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX23_2982), 项目负责人: 王振鑫

引用本文: 王振鑫, 周鹏, 褚福超, 张大振, 袁峰. Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA 复合纳米平台加强肿瘤化学动力学的可行性[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(29):4612-4619.



Abstract

BACKGROUND: The low catalytic activity and lack of targeting of commonly used metal ions have severely limited the clinical application of chemodynamic therapy in tumor treatment. On the other hand, although the composite nanoplateforms are endowed with tumor-targeting functions by surface functionalization, the lack of tumor microenvironment acidity also severely weakens the efficacy of chemodynamic therapy.

OBJECTIVE: To prepare novel composite nanoplateforms and assess their feasibility to enhance the effects of chemodynamic therapy at the cellular level.

METHODS: SLC-0111-loaded zeolite imidazole framework-8 doped with divalent iron ions (Fe^{2+}) and divalent cobalt ions (Co^{2+}) ($\text{Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111}$) was synthesized by ion-exchange reaction and self-assembly, and loaded with hyaluronic acid (HA) by electrostatic adsorption, followed by obtaining the target nanoparticles $\text{Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA}$ (abbreviated as FC-S). Meanwhile, nanoparticles Fe-Co/ZIF-8-HA (abbreviated as FC) without SLC-0111 were synthesized by the same method. The nanocomposite platform was tested for particle size, zeta potential, surface morphology, *in vitro* reactive oxygen species generation, and ability to consume glutathione. Human osteosarcoma cell MG-63 and mouse fibroblast cell L929 were used as experimental subjects. The cytotoxicity of FC-S was detected by CCK-8 assay. Human osteosarcoma cell MG-63 was used as the experimental object to detect the cell internalization of FC-S. In addition to H_2O_2 , the effects of FC-S and FC on intracellular pH, carbonic anhydrase 9 protein expression, cell viability and apoptosis, intracellular reactive oxygen species and glutathione content, and mitochondrial membrane potential were investigated.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The FC-S composite nanoplateform was successfully prepared with a well-defined rhombic dodecahedral structure, uniform size and good dispersion. Its particle size was about 323 nm; zeta potential was about -11.1 mV, and the nanoplateform had a certain reactive oxygen species generation capacity *in vitro*. (2) FC-S nanoplateforms accumulated intracellularly in a time-dependent manner and could successfully escape from lysosomes. When the mass concentration of FC-S was ≤ 20 $\mu\text{g/mL}$, there was no obvious cytotoxicity to MG-63 cells and L929 cells, and 20 $\mu\text{g/mL}$ FC-S was selected to act on MG-63 cells in subsequent experiments. (3) Compared with FC group, the protein expression of carbonic anhydrase 9 in MG-63 cells in FC-S group was decreased ($P < 0.01$); the intracellular acidic environment was enhanced; the content of reactive oxygen species was increased ($P < 0.001$); the mitochondrial damage was aggravated; the number of dead cells was increased, and the apoptosis rate was increased ($P < 0.001$). (4) The results indicate that FC-S, as a novel composite nanoplateform, can effectively improve the weakly acidic microenvironment in tumor cells and enhance the level of intracellular reactive oxygen species production, thus enhancing the efficacy of chemodynamic therapy.

Key words: nanoplateform; chemodynamic therapy; carbonic anhydrase 9; carbonic anhydrase 9 inhibitor; reactive oxygen species; apoptosis

Funding: Key Project of Jiangsu Provincial Health Commission Medical Research, No. ZD2022064 (to YF); Jiangsu Province Traditional Chinese Medicine Technology Development Plan, No. MS2021102 (to YF); Key Laboratory Construction Project for Bone Tissue Regeneration and Digital Medicine, No. PT0306 (to YF); Jiangsu Province Graduate Research Innovation Program Project, No. KYCX23_2982 (to WZX)

How to cite this article: WANG ZX, ZHOU P, CHU FC, ZHANG DZ, YUAN F. $\text{Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA}$ composite nanoplateform enhances feasibility of tumor chemodynamic therapy. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(29):4612-4619.

0 引言 Introduction

化学动力学疗法是使用过渡金属纳米材料作为催化剂，利用过氧化氢催化芬顿或类芬顿反应发生并产生剧毒羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)，从而达到杀伤肿瘤细胞目的的一种新型肿瘤治疗策略^[1-5]，近年来因其高选择性和内源性激活的特性而受到广泛关注。羟基自由基属于众多活性氧分子中的一员，具有强大的氧化功能，通过破坏肿瘤细胞的蛋白质、线粒体和遗传物质来诱导癌细胞死亡^[6-9]。然而，化学动力学疗法也存在一些局限性：一方面，常用金属离子的催化活性较低，不能产生足够的羟基自由基；另一方面，肿瘤细胞内的 pH 值也不是芬顿或类芬顿反应的最佳条件^[10-12]。为此，研究人员已经开发出多种除铁基之外的金属纳米材料用于高效诱导化学动力学疗法的疗效^[13-16]。

目前研究最多的化学动力学催化剂是锰基和铜基材料，钴基和钼基材料研究较少。钴 (Co) 是维持生物体稳定性的维生素 B12 和其他钴胺素的一部分， Co^{2+} 在弱酸甚至中性条件下均表现出明显的类芬顿催化性能，其催化效率高于铁、铜、锰等其他催化剂，研究表明 Co^{2+} 催化的类芬顿反应具有较宽的 pH 值反应范围和更为高效的催化活性，可以打破传统化学动力学治疗低 pH 值环境的反应限制^[17-18]。然而，肿瘤细胞通过产生高水平谷胱甘肽来增强内源性抗氧化系统，可有效消除肿瘤部位的活性氧水平，进而降低化学动力学疗效。在众多纳米金属材料中，铁离子可以在谷胱甘肽还原反应与芬顿 / 类芬顿反应之间形成价态循环，持续地诱导谷胱甘肽消耗和羟基自由基产生，增强化学动力学疗法的疗效^[19-20]。因此，通过共同负载铁、钴离子增加羟基自由基的产生并消耗肿瘤内源性高水平谷胱甘肽，进而提升化学动力学疗法的疗效是一个理想选择。

碳酸酐酶 9 是维持肿瘤细胞内外 pH 值平衡的关键酶，同时被鉴定为肿瘤相关蛋白，除了胃肠黏膜组织外在正常组织中几乎不表达，而在包括骨肉瘤等缺氧恶性肿瘤中却是过表达靶点，是癌症进展的一个关键标志^[21-24]。SLC-0111 为一种新型碳酸酐酶抑制剂，可有效抑制碳酸酐酶 9 的表达，从而促进肿瘤细胞内质子堆积，将 pH 值维持在芬顿或类芬顿反应合适的阈值范围内，促进更多羟基自由基的生成，用于加强化学动力学疗法的疗效^[25-28]。

基于以上分析，此次实验设计了二价铁离子 (Fe^{2+}) 和二价钴离子 (Co^{2+}) 掺杂的沸石咪唑骨架-8 作为载体材料，利用其多孔结构成功负载了 SLC-0111 (碳酸酐酶小分子抑制剂) 并包裹透明质酸作为外壳，得到了 $\text{Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA}$ 复合纳米平台，用于增强化学动力学疗法的疗效。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 完全随机设计方法。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 12 月至 2023 年 8 月在徐州医科大学公共实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 主要细胞与试剂 人骨肉瘤细胞 MG-63 和小鼠成纤维细胞 L929 购自中国科学院上海细胞库；六水合硝酸钴 [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]、六水合硝酸锌 [$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]、七水合硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、2- 甲基咪唑、透明质酸、亚甲基蓝购于阿拉丁试剂 (上海) 有限公司；SLC-0111、异硫氰酸荧光素 (FITC) 购自美国 MedChemexpress 生物科技公司；pH 值荧光探针 (BCECF AM)、线粒体膜电位检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司；PBS(0.01 mol/L)、胰蛋白酶

化酶 (0.25%)、不含 EDTA 的胰蛋白酶 (0.25%)、 α -MEM 培养基、CCK-8 检测试剂盒、活性氧检测试剂盒、细胞活死染色试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司；胎牛血清购自美国 CLARK 生物科技公司。

1.3.2 主要设备与仪器 透射电子显微镜 (美国 FEI, Tecnai™ G2 TWIN); 扫描电子显微镜 (美国 FEI, Teneo VS); 紫外分光光度计 (北京瑞利, UV-1601); 多角度粒径与电位分析仪 (美国 Ambivalu, NanoBrook Omni)、傅里叶红外光谱仪 (德国 Bruker, VERTEX 70); 酶标仪 (美国 BIOTEK, Synergy2); 双红外激光成像系统 (美国 LI-COR, Odyssey CLX); 激光扫描共聚焦显微镜 (德国 Leica, STELLARIS 5); 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson, FACS Canto II)。

1.4 方法

1.4.1 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111 的制备 分别称取 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1 mmol, 29.1 mg)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.07 mmol, 19.5 mg) 和 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol, 297.5 mg) 并分散在 30 mL 甲醇中超声混匀, 记为溶液 A, 在氮气下搅拌 1 h。分别称取 2-甲基咪唑 (4 mmol, 328.4 mg) 和 SLC-0111 (0.1 mmol, 30.9 mg) 并分散在 30 mL 甲醇中超声混匀, 记为溶液 B。在三颈烧瓶中, 将溶液 B 快速加入到溶液 A 中进行混合, 在氮气流下室温搅拌 12 h。6 000 r/min 离心 15 min 后弃上清, 沉淀即为 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111, 用 120 mL 甲醇洗涤 3 次。为了在催化反应中使用该材料, 将样品放入真空烘箱中 200 °C 下干燥 6 h 来激活, 然后自然冷却至室温。使用前将装有样品粉末的小瓶盖紧并在室温下储存。

1.4.2 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA 的制备 称取 50 mg 透明质酸超声分散于 25 mL 去离子水中。称取 10 mg Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111 快速加入到透明质酸溶液中, 室温下 800 r/min 搅拌 12 h。10 000 r/min 离心 15 min 后弃上清, 沉淀即为 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA (记为 FC-S)。采用相同方法合成不载 SLC-0111 的纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8-HA (记为 FC)。

称取 10 mg FC-S 超声分散于 50 mL 去离子水中。称取 1 mg FITC 粉末加入到 FC-S 分散液中, 室温下 600 r/min 避光搅拌 24 h, 10 000 r/min 离心 15 min 后弃去上清液, 沉淀即为 FITC 标记的 FC-S。

1.4.3 FC-S 的理化性质表征

形貌结构: 使用透射电子显微镜观察包裹透明质酸前后材料的内部形态。

粒径和 Zeta 电位: 通过多角度粒径仪与电位分析仪分别检测 FC-S 的粒径和 Zeta 电位, 评估其稳定性和在水溶液中的分散性。

药物负载: 通过傅里叶红外光谱仪检测 SLC-0111 特征性羰基键和透明质酸羧基键与糖基键, 证明 Fe-Co/ZIF-8 和 SLC-0111 与透明质酸是否有效共存。取溴化钾粉末, 研磨后置于压片机制片, 等待 2 min 后取下压片进行背景扫描。随后, 取待测样品以 1 : 5 的质量比与溴化钾混合研磨制片, 进行样品扫描。

载药率与包封率: 通过紫外-分光光度计检测不同质量浓度 SLC-0111 在甲醇中 267 nm 处的吸光度值, 绘制浓度-吸光度值标准曲线。取 FC-S 第 1 次离心后的上清液, 检测其在 267 nm 处的吸光度值, 代入计算上清液中所含 SLC-0111 质量。

载药率 = 材料中 SLC-0111 质量 / 材料总质量 $\times 100\%$,

包封率 = 材料中 SLC-0111 质量 / SLC-0111 投入总质量 $\times 100\%$ 。

羟基自由基产生能力: 用 PBS (pH=6.5) 配置不同质量浓度 (0, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 FC-S 溶液, 加入含亚甲基蓝 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 H_2O_2 (10 mmol/L) 的 PBS (pH=6.5) 中 37 °C 下反应 30 min。通过 664 nm 处的特征吸收变化检测亚甲基蓝的降解。此外还检测了 FC-S 在不同酸性溶液 (pH=5.0, 6.0, 7.0 和 7.4) 中产生羟基自由基的能力。

谷胱甘肽消耗能力: 将谷胱甘肽 (1 mmol/L) 与分散在 PBS (pH=6.5) 中的不同质量浓度 (0, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 FC-S 共孵育 3 h。加入 5, 5'-二硫硝基苯甲酸 (DTNB, 0.5 mmol/L), 在 412 nm 处测量残留谷胱甘肽的吸光度值。

1.4.4 FC-S 的细胞内化与细胞毒性

细胞培养: 将 MG-63 细胞接种于直径为 10 cm 的培养皿中, 培养于含体积分数 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养, 当细胞融合度达到 80%~90% 时进行传代, 每 2 d 传代 1 次。将 L929 细胞接种于培养瓶中, 培养于含体积分数 10% 胎牛血清、1% 双抗的 α -MEM 培养基中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养, 当细胞融合度达到 80%~90% 时进行传代, 每两三天传代 1 次。

细胞摄取: 将第 4 代 MG-63 细胞接种到共聚焦皿中, 细胞密度 1×10^4 / 皿, 孵育 12 h 后细胞贴壁, 吸弃旧培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入 2 mL 含 FITC 标记 FC-S (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 α -MEM 培养基继续培养。孵育 2, 4 和 8 h 后, 加入红色溶酶体示踪剂继续孵育 2 h, 每皿加入 500 μL DAPI 染核 10 min, 最后加入 300 μL 40 g/L 多聚甲醛固定, 通过激光扫描共聚焦显微镜获得荧光图像。孵育 2, 4 和 8 h 后, 胰酶消化并收集细胞, 制备单细胞悬液后使用流式细胞仪定量分析 FITC 荧光强度。

细胞毒性: 利用 CCK-8 试剂盒分析 FC-S 的细胞毒性。将第 4 代 MG-63 细胞和 L929 细胞分别接种到 96 孔板中, 细胞密度均为 1×10^4 / 孔, 孵育过夜, 吸弃旧培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 每孔加入含有不同质量浓度 (0, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) FC-S 的 α -MEM 培养基, 继续培养 24 h。吸弃培养基, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 100 μL 含有体积分数 10% CCK-8 试剂的 α -MEM 培养基, 避光孵育 2 h。检测 450 nm 处的吸光度值。细胞相对存活率 (%) = [(实验孔吸光度值 - 空白孔吸光度值) / (对照孔吸光度值 - 空白孔吸光度值)] $\times 100\%$ 。加入细胞与单纯 α -MEM 培养基的为对照孔, 仅加入单纯 α -MEM 培养基不加细胞的为空白孔。

1.4.5 FC-S、FC 与 MG-63 细胞共培养实验

蛋白质印迹分析: 将第 5 代 MG-63 细胞接种到直径为 10 cm 的培养皿中过夜, 每皿 1.5×10^6 个细胞, 吸弃旧培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 分 3 组干预: 对照组加入 10 mL 含 0.01 mol/L PBS 的 α -MEM 培养基, FC 组加入 10 mL 含 25 μ g/mL FC、100 μ mol/L H_2O_2 的 α -MEM 培养基, FC-S 组加入含 25 μ g/mL FC-S、100 μ mol/L H_2O_2 的 α -MEM 培养基。孵育 12 h 后, 使用含 PMSF 的 RIPA 裂解液提取细胞蛋白, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。配置 8% 聚丙烯酰胺凝胶上样后在 80 V 下电泳 4 h。电泳结束后在 300 mA 下电转膜 30 min, 对蛋白条带进行封闭并孵育碳酸酐酶 9 与 Vinculin 抗体 (内参), 检测碳酸酐酶 9 蛋白的表达。

细胞内 pH 值检测: 将第 5 代 MG-63 细胞接种到共聚焦皿中, 细胞密度为 5×10^4 /皿, 孵育 12 h 后细胞完全贴壁, 吸弃旧培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 按蛋白质印迹分析实验分组干预。孵育 6 h 后, 用 PBS 冲洗细胞, 每皿加入 1 mL pH 值荧光探针 (BCECF AM, 5 μ mol/L) 染色液, 染色 30 min 后使用激光扫描共聚焦显微镜观察并拍照。

细胞内活性氧产生检测: 将第 5 代 MG-63 细胞接种到共聚焦皿中, 密度为 5×10^4 /皿, 孵育 12 h 后细胞完全贴壁, 吸弃旧培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 按蛋白质印迹分析实验分组干预。孵育 6 h 后, 每皿加入 1 mL 10 μ mol/L 活性氧荧光探针 DCFH-DA 共孵育 20 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。同时使用流式细胞仪检测活性氧相对荧光强度。

细胞内谷胱甘肽水平检测: 将第 5 代 MG-63 细胞接种到 6 孔板中, 细胞密度为 3×10^5 /孔, 孵育 12 h 细胞完全贴壁后吸弃旧培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 按蛋白质印迹分析实验分组干预。孵育 6 h 后, 使用谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽检测试剂盒测定谷胱甘肽水平。

细胞线粒体损伤: 将第 5 代 MG-63 细胞接种到共聚焦皿中, 细胞密度为 8×10^4 /皿, 孵育 12 h 细胞完全贴壁, 吸弃旧培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 按蛋白质印迹分析实验分组干预。孵育 6 h 后, 用 PBS 洗涤细胞, 按照制造商说明用 JC-1 试剂 (绿色或红色) 和 DAPI (蓝色) 对细胞进行染色, 使用激光扫描共聚焦显微镜获取荧光图像。同时, 采用流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位。

细胞活死染色与凋亡检测: 将第 5 代 MG-63 细胞接种到 6 孔板中, 细胞密度为 3×10^5 /孔, 孵育 12 h 后细胞完全贴壁, 吸弃旧培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 按蛋白质印迹分析实验分组干预。孵育 6-8 h 后, 每孔加入细胞活死染色工作液 (5 μ mol/L, 1 mL) 避光孵育 30 min, 用 PBS 洗涤 2 次, 倒置荧光显微镜下观察并拍照。孵育 6-8 h 后, 吸弃旧培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.5 主要观察指标 ①检测 FC-S 复合纳米平台的理化性质;

②验证 FC-S 复合纳米平台的体外抗肿瘤效果。

1.6 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$

认为差异有显著性意义。该文统计学方法已经徐州医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 FC-S 的理化性质

2.1.1 FC-S 的微观形貌与 Zeta 电位 采用经典的一锅法合成 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111 纳米颗粒, 同时在表面包裹透明质酸后得到 FC-S 复合纳米平台。透射电镜下可见包裹透明质酸前后的纳米颗粒均具有菱形十二面体结构, 尺寸均匀, 见图 1A、B。包裹透明质酸前后纳米颗粒的粒径分布与电位检测结果, 见图 1C-E。纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111 的平均粒径为 295.3 nm, 电位为 +13.73 mV; FC-S 的粒径约为 323 nm, 电位降低到 -11.1 mV。

2.1.2 FC-S 的载药率与包封率 图 2A 是 SLC-0111 在 267 nm 处的紫外-可见吸光度值, 绘制了浓度-吸光度值标准曲线, 见图 2B。通过标准曲线和公式计算得出 FC-S 的载药率为 23.3%、包封率为 90.5%。

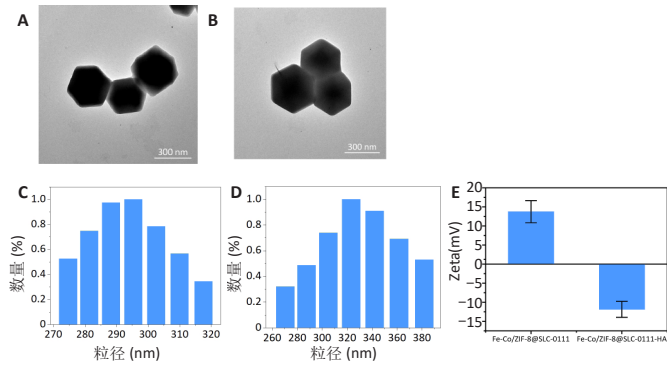
2.1.3 FC-S 的药物负载情况 图 3A 是验证 SLC-0111 和透明质酸成功加载的结果图, 在傅里叶变换红外光谱中, SLC-0111 在 1692 cm^{-1} 处出现的特征性吸收峰是羰基键伸缩振动吸收峰, 而 ZIF-8 典型的 C=N 拉伸振动吸收峰在 1513 cm^{-1} 处出现, 证明了 Fe-Co/ZIF-8 和 SLC-0111 的有效共存。此外在透明质酸包覆后, 光谱中 1407 cm^{-1} 处和 946 cm^{-1} 处分别出现明显的羧基键和糖特征吸收峰, 与 Zeta 电位结果共同证实了透明质酸的成功包覆。

2.1.4 FC-S 产生羟基自由基与消耗谷胱甘肽的能力 图 3B、C 是亚甲基蓝降解曲线, 用于评估 FC-S 在 PBS 中产生活性氧的能力。结果显示随着 FC-S 质量浓度的增加和体外酸性环境的增强, 吸光度值降低, 说明产生的羟基自由基增加。图 3D 是对 FC-S 体外谷胱甘肽消耗功能的验证, 结果表明随着时间的增加, 谷胱甘肽消耗越多。

2.2 FC-S 的细胞内化与细胞毒性

2.2.1 肿瘤细胞对 FC-S 的摄取 细胞对 FC-S 的有效摄取以及纳米平台进入细胞后从溶酶体中的成功逃逸是触发后续治疗的关键。实验利用 FITC (绿色荧光) 标记了 FC-S, 同时使用红色溶酶体探针进行溶酶体定位。激光共聚焦显微镜下可见绿色荧光强度随着时间的增加而增强, 与溶酶体的红色荧光在纳米平台上叠加后可见越来越多的黄色荧光, 表明 FC-S 能够有效地被肿瘤细胞内化并随时间而逐渐释放, 见图 4A。图 4B 为流式细胞仪定量分析 FITC 荧光强度变化, 与激光共聚焦显微镜观察结果一致。

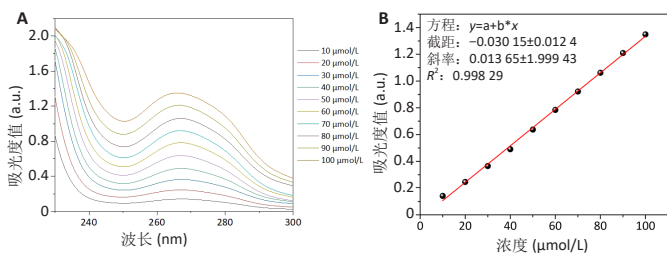
2.2.2 FC-S 的细胞毒性 CCK-8 检测显示在 24 h 内, 两种细胞相对存活率随着 FC-S 质量浓度的升高而降低, 但细胞相对存活率均 $> 80\%$, 说明 FC-S 具有很高的生物安全性; 当 FC-S 质量浓度达到 25 μ g/mL 时, 两种细胞相对存活率均较 FC-S 质量浓度 5 μ g/mL 时显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.0001$), 见图 5。因此后续实验选择 20 μ g/mL 的 FC-S。



图注: A、B 分别为 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111 与 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA 的透射电镜图像; C、D 分别为包裹透明质酸前 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111 与包裹透明质酸后 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA 的粒径分布; E 为 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111 与 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA 的 Zeta 电位。

图 1 | 纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA 的粒径和 Zeta 电位及透射电镜图像

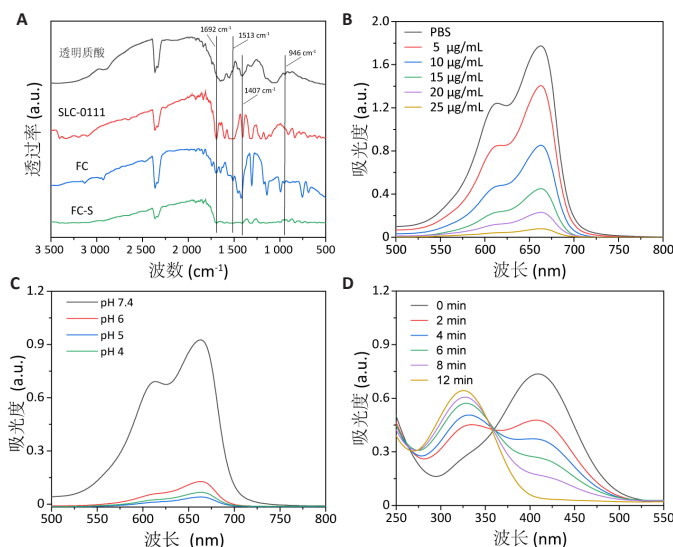
Figure 1 | Particle size and zeta potential as well as transmission electron microscopy images of Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA nanoplateforms



图注: A 为不同浓度 SLC-0111 的紫外-可见吸收光谱; B 为绘制的 SLC-0111 浓度-吸光度值标准曲线。

图 2 | 小分子碳酸酐酶抑制剂 SLC-0111 标准曲线检测

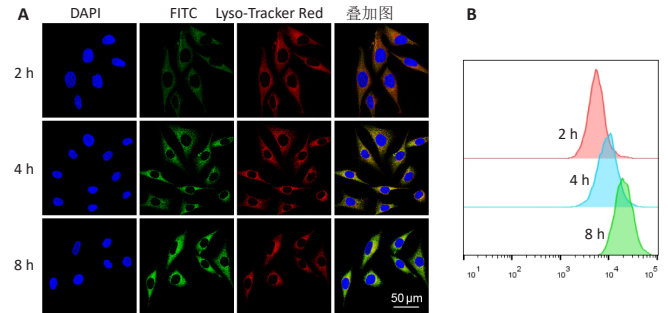
Figure 2 | Measurement of small molecule carbonic anhydrase inhibitor SLC-0111 standard curves



图注: FC 为 Fe-Co/ZIF-8-HA。A 为不同物质的傅里叶变换红外光谱, 以验证 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA 中 SLC-0111 负载情况; B 为 FC-S 体外产生活性氧功能验证, 亚甲基蓝在 664 nm 处的吸光度值越低代表活性氧生成越多; C 为不同 pH 值下 FC-S 产生活性氧功能验证; D 为不同时间 FC-S 体外消耗谷胱甘肽功能验证。

图 3 | 纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA(FC-S) 的药物负载与羟基自由基产生、谷胱甘肽消耗功能验证

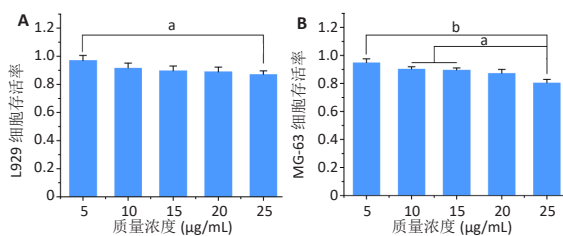
Figure 3 | Validation of drug loading, hydroxyl radical production and glutathione consumption of Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA (FC-S) nanoplateforms



图注: A 为不同时间细胞摄取纳米颗粒的荧光图, DAPI 为细胞核蓝色染料, FITC 为连接在 FC-S 上的绿色荧光素, Lyso-Tracker Red 是溶酶体红色荧光探针, 标尺 =50 μm; B 为流式细胞仪分析 FITC 荧光强度随时间的变化图。

图 4 | MG-63 细胞对纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA 的摄取行为

Figure 4 | Uptake behavior of MG-63 cells on Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA nanoplateforms



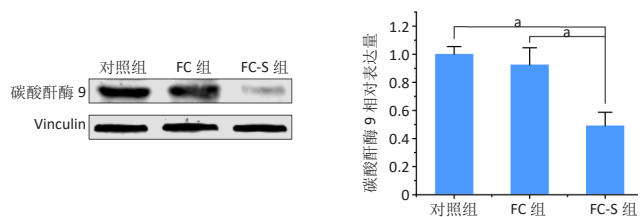
图注: A 为不同质量浓度纳米颗粒孵育后 L929 细胞相对存活率, B 为不同质量浓度纳米颗粒孵育后 MG-63 细胞相对存活率。^a*P*<0.01, ^b*P*<0.0001。

图 5 | 纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA 的细胞毒性

Figure 5 | Cytotoxicity of Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA nanoplateforms

2.3 FC-S、FC 与 MG-63 细胞共培养实验结果

2.3.1 MG-63 细胞内碳酸酐酶 9 蛋白的表达 在成功验证 FC-S 可以被 MG-63 细胞有效摄取的基础上, 进一步探索 FC-S 对该细胞碳酸酐酶 9 蛋白表达的影响。蛋白质印迹分析结果显示, FC-S 组细胞内碳酸酐酶 9 蛋白表达低于对照组、FC 组 (*P*<0.01), 见图 6。



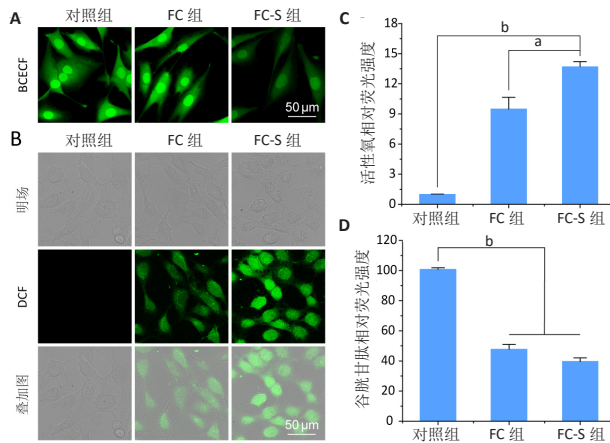
图注: 对照组为 PBS 干预组, FC 组为纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8-HA+H₂O₂ 干预组, FC-S 组为纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA+H₂O₂ 干预组。^a*P*<0.01。

图 6 | 各组 MG-63 细胞内碳酸酐酶 9 蛋白表达

Figure 6 | Carbonic anhydrase 9 protein expression in MG-63 cells of each group

2.3.2 MG-63 细胞内 pH 值变化与活性氧产生 在碳酸酐酶 9 被成功阻断的情况下, 使用 BCECF 指示剂进一步评估细胞内 pH 值变化。结果显示相较于对照组与 FC 组, FC-S 组细胞绿色荧光减弱, 表明当碳酸酐酶 9 活性受抑制时细胞内质子外排受阻, 可有效增强细胞内酸性环境, 见图 7A。

采用 2', 7'-二氯荧光素 (DCF) 作为荧光指示剂检测各组细胞内活性氧水平, 评估细胞内氧化应激程度。如图 7B 所示, 与对照组几乎没有荧光相比, FC 组呈现出中等强度的绿色荧光, 这是由于铁钴双金属离子催化芬顿和类芬顿反应的发生, 产生了羟基自由基; 在纳米颗粒引入 SLC-0111 后绿色荧光强度显著增强, 显示出良好的活性氧生成能力, 这主要是由于 SLC-0111 所导致细胞内酸度的增加。流式细胞仪检测显示, FC-S 组绿色荧光强度高于对照组、FC 组 ($P < 0.001$, $P < 0.0001$), 见图 7C。图 7D 为不同纳米颗粒对谷胱甘肽的消耗功能, 结果显示 FC-S 组、FC 组细胞内谷胱甘肽均低于对照组 ($P < 0.0001$)。

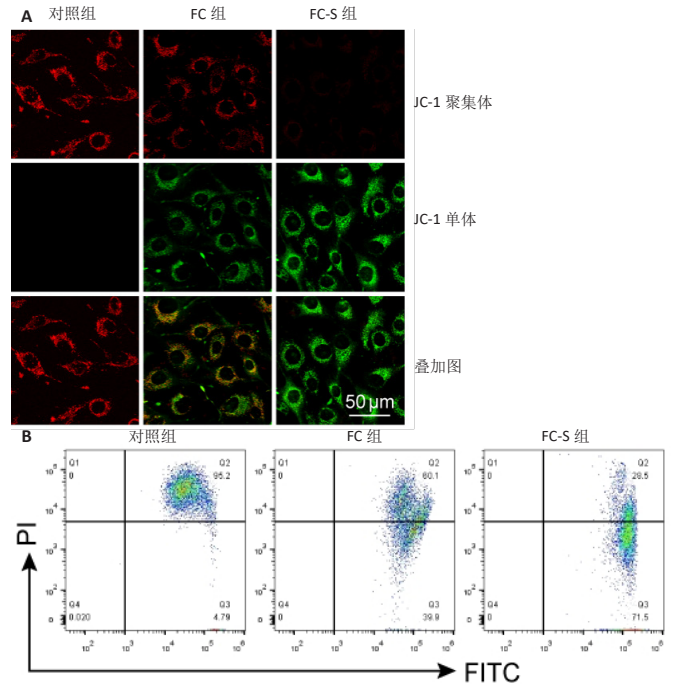


图注: 对照组为 PBS 干预组, FC 组为纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8-HA+H₂O₂ 干预组, FC-S 组为纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA+H₂O₂ 干预组。A 为使用 BCECF 荧光探针检测细胞内 pH 值变化, 标尺 = 50 μm; B 为使用 DCF 活性氧探针检测细胞内活性氧产生, 标尺 = 50 μm; C 为使用流式细胞仪检测细胞内活性氧产生; D 为细胞内谷胱甘肽水平。^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.0001$ 。

图 7 | 各组 MG-63 细胞内 pH 值及活性氧产生、谷胱甘肽消耗能力
Figure 7 | pH regulation, reactive oxygen species production and glutathione consumption in MG-63 cells of each group

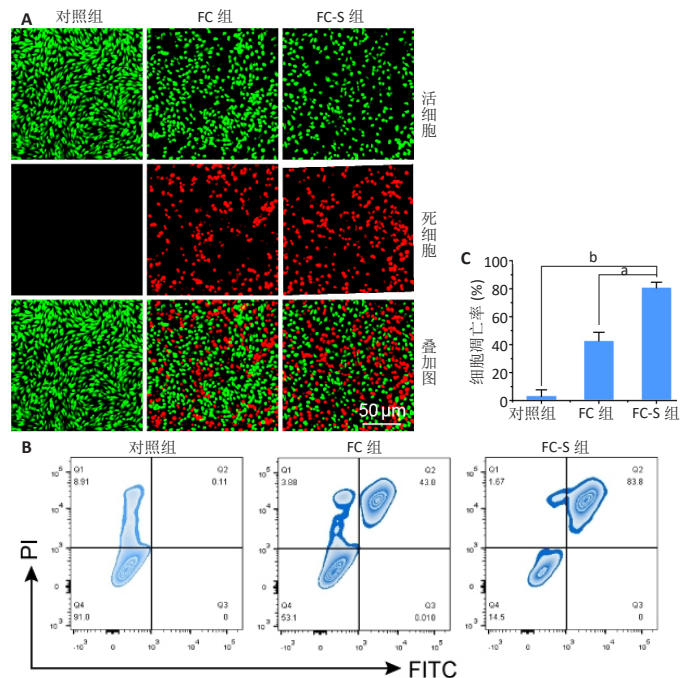
2.3.3 MG-63 细胞线粒体膜电位变化 细胞内大量活性氧的产生往往会伴随线粒体功能损伤, 使得线粒体膜电位发生变化, 因此实验使用 JC-1 染料来评估线粒体膜电位的变化。JC-1 染料染色显示对照组红色信号较强, 说明线粒体膜电位保持正常; FC 组红色信号稍有减弱, 虽然绿色荧光信号稍显增加, 但整体荧光强度较弱, 表明线粒体损伤程度较轻; 绿色荧光在 FC-S 组最为突出, 而红色荧光几乎不存在, 说明该实验组大部分 MG-63 细胞线粒体的损伤较为明显, 这与细胞内活性氧产生的规律一致, 见图 8A。图 8B 是通过流式细胞仪分析线粒体跨膜电位去极化率, FC-S 组比例达到了 71.5%, 表明该组凋亡细胞最多。

2.3.4 FC-S 的 MG-63 细胞杀伤作用 通过活死细胞双染直观地观察了 FC-S 高体外抗肿瘤效果, 结果显示 FC 组死亡细胞量多于对照组, FC-S 组死亡细胞数量多于 FC 组, 见图 9A。图 9B、C 流式细胞仪定量分析各组细胞凋亡情况, FC-S 组细胞凋亡率高于对照组、FC 组 ($P < 0.001$, $P < 0.0001$), 表明 SLC-0111 对化学动力学疗法疗效有较好的增强作用。



图注: 对照组为 PBS 干预组, FC 组为纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8-HA+H₂O₂ 干预组, FC-S 组为纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA+H₂O₂ 干预组。A 为细胞内线粒体膜电位变化, 使用 JC-1 荧光探针作为指示剂, 当线粒体膜电位正常时, JC-1 聚集在线粒体基质中形成聚合物, 产生红色荧光; 当细胞受损时, 线粒体膜电位降低时 JC-1 形成单体, 产生绿色荧光; 标尺 = 50 μm。B 为流式细胞仪分析线粒体膜电位。

图 8 | 各组 MG-63 细胞内线粒体膜电位变化
Figure 8 | Changes in mitochondrial membrane potentials in MG-63 cells of each group



图注: 对照组为 PBS 干预组, FC 组为纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8-HA+H₂O₂ 干预组, FC-S 组为纳米颗粒 Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111-HA+H₂O₂ 干预组。图 A 为细胞活死染色, 红色显示死亡细胞, 绿色显示活细胞, FC 组死亡细胞量多于对照组, FC-S 组死亡细胞数量多于 FC 组, 标尺 = 50 μm。B、C 分别为流式细胞仪检测细胞凋亡图与细胞凋亡率的定量分析结果, ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.0001$ 。

图 9 | 各组 MG-63 细胞活性与凋亡情况
Figure 9 | Viability and apoptosis of MG-63 cells in each group

3 讨论 Discussion

近年来随着双金属纳米材料的开发,利用双金属叠加引起的氧化还原酶活性增加可以有效解决铁离子本身无法在肿瘤细胞中产生足量羟基自由基的难题,这极大推动了化学动力学疗法在肿瘤治疗中的应用^[29-30]。然而由于肿瘤细胞内酸度的不足,尽管肿瘤中过氧化氢水平高于正常组织,但仍不足以产生大量的羟基自由基,这也严重限制了化学动力学疗法向临床转化的进一步发展,因此通过掺杂双金属离子并提高肿瘤细胞内的酸性以优化活性氧产生条件,已经成为了目前肿瘤治疗的重点之一。基于此,实验设计了一种新型复合纳米平台 FC-S,有效增加了细胞内活性氧的产生,用于增强化学动力学疗法的疗效。

首先,使用沸石咪唑骨架(ZIF-8)作为模板,同时掺杂铁钴双金属离子与碳酸酐酶9小分子抑制剂。ZIF-8由锌与咪唑(或咪唑衍生物)环上的N以四配位的方式自组装而成,具有一系列的结构且易于功能化,并且相较于其他金属有机框架材料还具有较好的热稳定性和化学稳定性,常被用作高效的离子与药物递送系统^[31-32]。一方面,ZIF-8的多孔性实现了药物负载的可能,提高了SLC-0111的载药率,并且避免了药物在运输过程中的泄露^[33-34];另一方面,ZIF-8具有酸性pH值响应性,这保证了纳米平台在肿瘤微环境中的特异性裂解释放,避免了对正常组织产生损伤。

Co²⁺作为一种类芬顿反应催化剂被广泛研究用于有机污染物的氧化,因其催化产生类芬顿具有较宽的pH值范围和更高效的催化活性,近年来基于Co²⁺的抗肿瘤纳米材料也备受关注,体外亚甲基蓝降解实验已证实了其强大的活性氧产生能力。同时,针对肿瘤细胞内酸性不足的问题,此次实验通过抑制肿瘤细胞碳酸酐酶9的表达来有效降低细胞内的pH值。SLC-0111是一种脲基取代的苯磺酰胺类碳酸酐酶小分子抑制剂,可以通过对碳酸酐酶9的强大特异性抑制作用调节肿瘤细胞pH值,因此实验使用ZIF-8作为模板有效装载铁钴双离子和SLC-0111小分子药物,实验结果表明成功合成了具有明确结构的形状均一的Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111纳米颗粒。

此外,针对纳米颗粒Fe-Co/ZIF-8@SLC-0111由于带有正电极易在血液循环中被清除的问题,实验采用透明质酸作为保护性外壳。透明质酸作为一种带负电的生物大分子化合物具有良好的生物相容性,能改善药物的水溶性和稳定性,常被用作一种高效的药物递送载体^[35-36];并且透明质酸具有主动和被动双靶向作用,可与肿瘤细胞表面过表达CD44结合促进了纳米颗粒在肿瘤区域的蓄集,实现靶向给药,增加肿瘤的给药效率,提高疗效^[37-38]。因此,此次实验使用透明质酸作为保护性靶向壳,最终构建了平均粒径约为323 nm的FC-S复合纳米平台,其Zeta电位约-11.1 mV,大小均一,在生理盐水中能稳定存在。

此次实验使用MG-63细胞作为模型细胞,评价FC-S纳米平台的体外抗肿瘤效果。首先,利用激光共聚焦激显微系统评估MG-63细胞内化FC-S的能力,结果表明FC-S以时

间依赖的方式在细胞内累积,并能成功从溶酶体中逃逸,这证明了透明质酸所介导的纳米颗粒可快速进入细胞。化学动力学疗法通过产生剧毒羟基自由基破坏肿瘤细胞的线粒体、DNA和蛋白质,诱导细胞坏死和凋亡,从而杀死肿瘤细胞。此次实验对FC-S纳米平台调节细胞内酸度和产生活性氧的功能进行了验证,结果可见SLC-0111的携带有效降低了肿瘤细胞内的pH值,并且FC-S组活性氧的产生也明显高于其他处理组,表明pH值下调使得Fe²⁺的催化效率得到了最大程度发挥,诱导产生了过量羟基自由基。同时对肿瘤细胞内谷胱甘肽水平进行了评估,发现Fe²⁺在被氧化为Fe³⁺之后有效降低了肿瘤细胞内谷胱甘肽水平,减少了羟基自由基的损失。进一步检测不同处理组抗肿瘤细胞生长的能力,结果发现FC组较对照组有一定的治疗作用,这是因为钴离子较宽的pH值反应范围和高效的催化活性产生了一定量的羟基自由基;而SLC-0111的加入与Fe³⁺对谷胱甘肽的消耗使得FC-S组细胞凋亡率最高,抗肿瘤效果最佳。化学动力学疗法通过对失调的氧化还原稳态进行特异性调控,为肿瘤干预提供了新的可能性。然而,此次实验只增加了金属催化离子并调节了肿瘤细胞内的酸性,并未增加过氧化氢作为催化芬顿和类芬顿反应的底物,由于肿瘤细胞内过氧化氢含量有限,化学动力学疗法的疗效并未得到最大程度发挥,未来可以考虑多途径协同提升羟基自由基的产量,以进一步诱导更为高效的肿瘤杀伤效应。

综上所述,实验开发了一种透明质酸封装的凋亡诱导剂FC-S,可用于增强化学动力学疗法的治疗效果,实验证明了该复合纳米平台既可通过抑制碳酸酐酶9的活性有效增加肿瘤细胞内的酸性,还能通过双金属协同作用高效催化羟基自由基的产生,显著抑制肿瘤细胞的增殖,为化学动力学疗法在癌症治疗领域应用提供了一种很有前景的策略。该研究还存在一些不足:该纳米平台需要进一步优化,减小粒径,从而促进在肿瘤组织更多的蓄积,并且尚未通过动物实验深入研究FC-S的生物安全性与抗肿瘤效果,这将是未来工作的重点。

作者贡献: 王振鑫负责实验设计和文章撰写;全体作者进行实验实施;通讯作者进行结果评估和文章审核。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] KOO S, PARK OK, KIM J, et al. Enhanced Chemodynamic Therapy by Cu-Fe Peroxide Nanoparticles: Tumor Microenvironment-Mediated Synergistic Fenton Reaction. ACS Nano. 2022;16(2):2535-2545.

- [2] ZHANG L, LI CX, WAN SS, et al. Nanocatalyst-Mediated Chemodynamic Tumor Therapy. *Adv Healthc Mater.* 2022;11(2):2101971.
- [3] MOHAMMED DF, MADLOOL HA, FARIS M, et al. Harnessing Inorganic Nanomaterials for Chemodynamic Cancer Therapy. *Nanomedicine.* 2022;17(24):1891-1906.
- [4] ZHAO P, LI H, BU W. A Forward Vision for Chemodynamic Therapy: Issues and Opportunities. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2023;62(7):202210415.
- [5] GAO H, CAO Z, LIU H, et al. Multifunctional Nanomedicines-Enabled Chemodynamic-Synergized Multimodal Tumor Therapy via Fenton and Fenton-like Reactions. *Theranostics.* 2023;13(6):1974-2014.
- [6] LI J, TIAN H, ZHU F, et al. Amorphous Ultra-Small Fe-Based Nanocluster Engineered and ICG Loaded Organo-Mesoporous Silica for GSH Depletion and Photothermal-Chemodynamic Synergistic Therapy. *Adv Healthc Mater.* 2022;11(21):2201986.
- [7] ZHUANG J, WANG B, CHEN H, et al. Efficient NIR-II Type-I AIE Photosensitizer for Mitochondria-Targeted Photodynamic Therapy through Synergistic Apoptosis-Ferroptosis. *ACS Nano.* 2023;17(10):9110-9125.
- [8] ZHANG W, DU XF, LIU B, et al. Engineering Supramolecular Nanomedicine for Targeted Near Infrared-triggered Mitochondrial Dysfunction to Potentiate Cisplatin for Efficient Chemophototherapy. *ACS Nano.* 2022;16(1):1421-1435.
- [9] GROELLY FJ, FAWKES M, DAGG RA, et al. Targeting DNA Damage Response Pathways in Cancer. *Nat Rev Cancer.* 2023;23(2):78-94.
- [10] LI W, YIN S, SHEN Y, et al. Molecular Engineering of pH-Responsive NIR Oxazine Assemblies for Evoking Tumor Ferroptosis via Triggering Lysosomal Dysfunction. *J Am Chem Soc.* 2023;145(6):3736-3747.
- [11] YANG Z, LUO Y, HU Y, et al. Photothermo-Promoted Nanocatalysis Combined with H₂S-Mediated Respiration Inhibition for Efficient Cancer Therapy. *Adv Funct Mater.* 2021;31:2007991.
- [12] ZUO W, CHEN W, LIU J, et al. Macrophage-Mimic Hollow Mesoporous Fe-Based Nanocatalysts for Self-Amplified Chemodynamic Therapy and Metastasis Inhibition via Tumor Microenvironment Remodeling. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022;14(4):5053-5065.
- [13] WU C, LIU Z, CHEN Z, et al. A Nonferrous Ferroptosis-Like Strategy for Antioxidant Inhibition-Synergized Nanocatalytic Tumor Therapeutics. *Sci Adv.* 2021;7(39):eabj8833.
- [14] MA Y, SU Z, ZHOU L, et al. Biodegradable Metal-Organic-Framework-Gated Organosilica for Tumor-Microenvironment-Unlocked Glutathione-Depletion-Enhanced Synergistic Therapy. *Adv Mater.* 2022;34(12):2107560.
- [15] XU N, HU A, PU X, et al. Cu-Chelated Polydopamine Nanoparticles as a Photothermal Medium and "Immunogenic Cell Death" Inducer for combined tumor therapy. *J Mater Chem B.* 2022;10(16):3104-3118.
- [16] DONG D, CHENG Z, WANG T, et al. Acid-Degradable Nanocomposite hydrogel and Glucose Oxidase Combination for Killing Bacterial with Photothermal Augmented Chemodynamic Therapy. *Int J Biol Macromol.* 2023;234:123745.
- [17] YANG Z, ZHANG L, WEI J, et al. Tumor Acidity-Activatable Photothermal/Fenton Nanoagent for Synergistic Therapy. *J Colloid Interface Sci.* 2022;612:355-366.
- [18] JIA C, GUO Y, WU FG. Chemodynamic Therapy via Fenton and Fenton-Like Nanomaterials: Strategies and Recent Advances. *Small.* 2022;18(6):2103868.
- [19] LIU Y, NIU R, DENG R, et al. Multi-enzyme Co-expressed Dual-Atom Nanozymes Induce Cascade Immunogenic Ferroptosis via Activating Interferon- γ and Targeting Arachidonic Acid Metabolism. *J Am Chem Soc.* 2023;145(16):8965-8978.
- [20] LIU Z, LIU S, LIU B, et al. Fe(III)-Naphthazarin Metal-Phenolic Networks for Glutathione-Depleting Enhanced Ferroptosis-Apoptosis Combined Cancer Therapy. *Small.* 2023;19:2207825.
- [21] MCDONALD PC, CHAFE SC, SUPURAN CT, et al. Cancer Therapeutic Targeting of Hypoxia Induced Carbonic Anhydrase IX: From Bench to Bedside. *Cancers.* 2022;14(14):3297.
- [22] GAO D, CHEN T, CHEN S, et al. Targeting Hypoxic Tumors with Hybrid Nanobullets for Oxygen-Independent Synergistic Photothermal and Thermodynamic Therapy. *Nanomicro Lett.* 2021;13(1):99.
- [23] QUEEN A, BHUTTO HN, YOUSUF M, et al. Carbonic anhydrase IX: A Tumor Acidification Switch in Heterogeneity and Chemokine Regulation. *Semin Cancer Biol.* 2022;86:899-913.
- [24] DI FIORE A, SUPURAN CT, SCALONI A, et al. Post-translational Modifications in Tumor-Associated Carbonic Anhydrases. *Amino Acids.* 2022;54(4):543-558.
- [25] CHAFE SC, VIZEACOMAR FS, VENKATESWARAN G, et al. Genome-Wide Synthetic Lethal Screen Unveils Novel CAIX-NFS1/xCT Axis as a Targetable Vulnerability in Hypoxic Solid Tumors. *Sci Adv.* 2021;7(35):eabj0364.
- [26] SARNELLA A, FERRARA Y, AULETTA L, et al. Inhibition of Carbonic Anhydrases IX/XII by SLC-0111 Boosts Cisplatin Effects in Hampering Head and Neck Squamous Carcinoma Cell Growth and Invasion. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022;41(1):122.
- [27] SU X, WANG WJ, CAO Q, et al. A Carbonic Anhydrase IX (CAIX)-Anchored Rhenium(I) Photosensitizer Evokes Pyroptosis for Enhanced Anti-Tumor Immunity. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2022;61(8):202115800.
- [28] WANG J, SUN Z, WANG S, et al. Biodegradable Ferrous Sulfide-Based Nanocomposites for Tumor Theranostics through Specific Intratumoral Acidosis-Induced Metabolic Symbiosis Disruption. *J Am Chem Soc.* 2022;144(43):19884-19895.
- [29] LIANG S, LIAO G, ZHU W, et al. Manganese-Based Hollow Nanoplatforams for MR Imaging-Guided Cancer Therapies. *Biomater Res.* 2022;26(1):32.
- [30] SANCHEZ-URIEL L, BONET-ALETA J, IBARRA A, et al. Heterogeneous-Driven Glutathione Oxidation: Defining the Catalytic Role of Chalcopyrite Nanoparticles. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces.* 2023;127(29):14146-14154.
- [31] AN P, FAN F, GU D, et al. Photothermal-Reinforced and Glutathione-Triggered In Situ Cascaded Nanocatalytic Therapy. *J Control Release.* 2020;321:734-743.
- [32] ZHAO J, TIAN Z, ZHAO S, et al. Insights into the Effect of Catalytic Intratumoral Lactate Depletion on Metabolic Reprogramming and Immune Activation for Antitumoral Activity. *Adv Sci.* 2023;10(4):2204808.
- [33] XIE H, LIU X, HUANG Z, et al. Nanoscale Zeolitic Imidazolate Framework (ZIF)-8 in Cancer Theranostics: Current Challenges and Prospects. *Cancers (Basel).* 2022;14(16):3935.
- [34] COLUCCIA M, PARISSÉ V, GUGLIELMI P, et al. Metal-Organic frameworks (MOFs) as Biomolecules Drug Delivery Systems for Anticancer Purposes. *Eur J Med Chem.* 2022;244:114801.
- [35] CHEN Y, LYU R, WANG J, et al. Metal-Organic Frameworks Nucleated by Silk Fibroin and Modified with Tumor-Targeting Peptides for Targeted Multimodal Cancer Therapy. *Adv Sci.* 2023;10(28):2302700.
- [36] LEI C, LIU XR, CHEN QB, et al. Hyaluronic Acid and Albumin Based Nanoparticles for Drug Delivery. *J Control Release.* 2022;331:416-433.
- [37] HASSN MESRATI M, SYAFRUDDIN SE, MOHTAR MA, et al. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules.* 2021;11(12):1850.
- [38] ZHANG R, ZHAO X, JIA A, et al. Hyaluronic Acid-Based Prodrug Nanomedicines for Enhanced Tumor Targeting and Therapy: A Review. *Int J Biol Macromol.* 2023;249:125993.

(责任编辑: GW, ZN, QY, YJ)