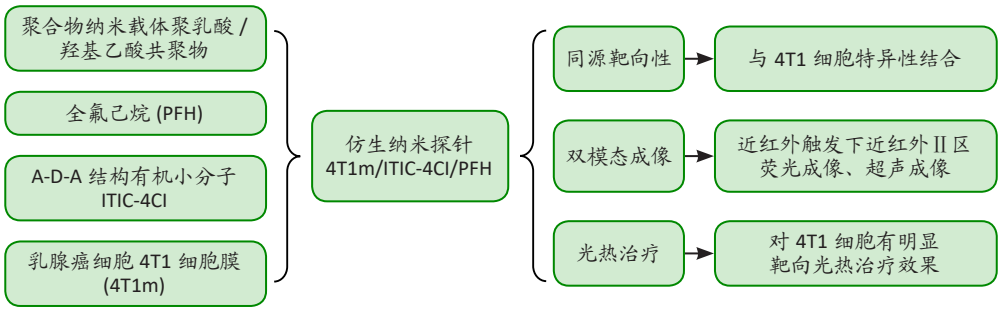
制备近红外光响应性仿生纳米探针及在乳腺癌光热诊疗中的应用

李文兰[1]，王文渊[1]，任文秀[2]，张玉佩[1]，杨小燕[1]，王志刚[3]，夏纪筑[1]

https://doi.org/10.12307/2023.983
投稿日期：2022-11-21
采用日期：2023-01-29
修回日期：2023-04-09
在线日期：2023-04-26
中图分类号：
R459.9；R318.08；R737.9
文章编号：
2095-4344(2024)05-00669-07
文献标识码：A

文章快速阅读：制备新型近红外光响应性仿生纳米探针用于乳腺癌靶向光热治疗



文题释义：

细胞膜仿生技术：通过将不同细胞膜包被于纳米粒表面赋予纳米粒新的生物学功能。纳米粒被细胞膜仿生修饰后，获得了细胞膜表面丰富的蛋白质并保留了纳米粒的高载药能力，延长了体内循环时间，使纳米粒具有逃避免疫系统、跨越各种生理屏障的能力。

A-D-A结构有机小分子材料：基于受体−供体−受体结构的有机小分子，具有优异的分子内电荷转移能力，在近红外区域具有强吸收峰，是一种理想的光热材料。

摘要

背景：光热疗法是一种新兴的肿瘤治疗手段，利用光热剂将光能转化为热能来实现肿瘤的无创消融。光热疗法与纳米技术的兴起为乳腺癌的治疗开辟了新视角。

目的：制备一种乳腺癌细胞膜修饰的新型近红外仿生纳米探针，探究其体外近红外荧光/超声显像效果，观察其体外对同源肿瘤细胞的靶向能力和光热治疗效果。

方法：以具有A-D-A结构的有机小分子ITIC-4Cl作为光热剂、聚乳酸/羟基乙酸共聚物为纳米载体、小鼠乳腺癌细胞4T1细胞膜为纳米颗粒表面修饰剂，并核心负载全氟己烷，采用双步乳化法与超声法制备新型近红外仿生纳米探针(4T1m/ITIC-4Cl/PFH)，对纳米探针进行基本表征，并验证其对同源肿瘤细胞的靶向性；探究纳米探针的光热性能及光热稳定性，观察激光照射下纳米探针的近红外荧光/超声成像效果；采用CCK-8法和钙黄绿素/碘化丙啶染色法评估纳米探针的光热治疗效果。

结果与结论：①制备的纳米探针4T1m/ITIC-4Cl/PFH尺寸均一、稳定性好，平均粒径为(92.7±2.3) nm，与乳腺癌4T1细胞膜具有相似的蛋白图谱；体外细胞摄取实验证实，该纳米探针可靶向同源乳腺癌4T1细胞；②纳米探针4T1m/ITIC-4Cl/PFH具有红移吸收光谱和延伸到近红外Ⅱ区的尾部发射，在激光辐照下可发出明亮的近红外Ⅱ区荧光信号；③经激光照射，纳米探针4T1m/ITIC-4Cl/PFH可相变为微气泡，增强超声显像；CCK-8和钙黄绿色/碘化丙啶染色结果显示，纳米探针4T1m/ITIC-4Cl/PFH对乳腺癌4T1细胞具有明显的光热杀伤效果；④结果表明，纳米探针4T1m/ITIC-4Cl/PFH具有靶向同源肿瘤的能力，并可增强近红外Ⅱ区波段荧光/超声显像和光热疗法疗效。

关键词：癌细胞膜；近红外荧光成像；双模态成像；光热治疗；A-D-A结构；纳米探针；纳米技术

缩略语：全氟己烷：Perfluorohexane，PFH

Preparation of a near-infrared photoresponsive biomimetic nanoprobe and its application in photothermal detection and treatment of breast cancer

Li Wenlan[1], Wang Wenyuan[1], Ren Wenxiu[2], Zhang Yupei[1], Yang Xiaoyan[1], Wang Zhigang[3], Xia Jizhu[1]
[1]Department of Ultrasound, [2]Department of Radiology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; [3]Chongqing Key Laboratory of Ultrasound Molecular Imaging, Chongqing 400010, China
Li Wenlan, Master candidate, Physician, Department of Ultrasound, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Corresponding author: Xia Jizhu, MD, Chief physician, Professor, Department of Ultrasound, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Photothermal therapy is a novel tumor treatment strategy that uses photothermal agents to transform light energy into heat energy to

西南医科大学附属医院，[1]超声医学科，[2]放射科，四川省泸州市 646000；[3]超声分子影像重庆市重点实验室，重庆市 400010
第一作者：李文兰，女，1995 年生，四川省泸州市人，西南医科大学附属医院在读硕士，执业医师，主要从事分子影像学研究。
通讯作者：夏纪筑，博士，主任医师，教授，西南医科大学附属医院超声医学科，四川省泸州市 646000
https://orcid.org/0000-0002-9852-9505(李文兰)

基金资助：国家自然科学基金青年基金 (81501481)，项目负责人：夏纪筑；四川省教育厅科研资助课题 (17ZA0438)，项目负责人：夏纪筑
引用本文：李文兰，王文渊，任文秀，张玉佩，杨小燕，王志刚，夏纪筑 . 制备近红外光响应性仿生纳米探针及在乳腺癌光热诊疗中的应用 [J]. 中国组织工程研究，2024，28(5):669-675.

accomplish non-invasive tumor ablation. The rise of photothermal therapy and nanotechnology has provided a new perspective on breast cancer treatment.
OBJECTIVE: To prepare a new type of near-infrared biomimetic nanoprobe that has been modified by breast cancer cell membrane, to investigate the effect of near-infrared fluorescence/ultrasound imaging *in vitro*, and to observe its targeting ability and photothermal therapy effect on homologous tumor cells *in vitro*.
METHODS: Organic small molecule ITIC-4Cl with A-D-A structure was used as photothermal agents; polylactic acid/glycolic acid copolymer as nanocarrier; 4T1 cell membrane of mouse breast cancer cells as a surface modifier of nanoparticles; perfluorohexane (PFH) was loaded. A novel near-infrared biomimetic nanoprobe (4T1m/ITIC-4Cl/PFH) was prepared by the double emulsion evaporation method and sonication method. The basic characterization of the nanoprobe and the homologous targeting ability were detected. The photothermal properties and photothermal stability of the probe were investigated, and the near-infrared fluorescence/ultrasound imaging effect of the probe under laser irradiation was observed. The CCK-8 assay and calcein/propidium iodide staining were used to assess the efficacy of photothermal therapy.
RESULTS AND CONCLUSION: (1) The prepared 4T1m/ITIC-4Cl/PFH nanoprobes had uniform size, high stability, and an average particle size of (92.7±2.3) nm. The probe's protein composition was identical to that of the 4T1 cell membrane. The nanoprobe's ability to target homologous 4T1 cells was validated by an *in vitro* cell uptake assay. (2) The nanoprobe had a red-shift absorption spectrum and tail emission extending to the near-infrared-II, which emitted a bright near-infrared-II fluorescence signal under laser irradiation. (3) After laser irradiation, the nanoprobe 4T1m/ITIC-4Cl/PFH could be turned into microbubbles and enhanced ultrasound imaging. The results of CCK-8 assay and calcein/propidium iodide staining showed that the nanoprobe 4T1m/ITIC-4Cl/PFH had an obvious photothermal killing effect on 4T1 cells. (4) The results show that the nanoprobe 4T1m/ITIC-4Cl/PFH has the ability to target homologous tumors and enhance near-infrared-II fluorescence imaging/ultrasound imaging and photothermal therapy effects.
Key words: cancer cell membrane; near-infrared fluorescence imaging; dual mude imaging; photothermal therapy; A-D-A structure; nanoprobe; nanotechnology

Funding: *National Natural Science Foundation of China for Youth, No. 81501481 (to XJZ); Scientific Research Project of Sichuan Provincial Department of Education, No. 17ZA0438 (to XJZ)*
How to cite this article: *LI WL, WANG WY, REN WX, ZHANG YP, YANG XY, WANG ZG, XIA JZ. Preparation of a near-infrared photoresponsive biomimetic nanoprobe and its application in photothermal detection and treatment of breast cancer. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(5):669-675.*

0 引言 Introduction

乳腺癌成为女性最常见的恶性肿瘤[1]，严重威胁着女性的生命健康。分子成像介导光热治疗近年来受到极大关注[2–4]。其中，近红外荧光成像在生物组织中的光散射少、组织背景小，具有较好的组织穿透能力[5-8]，在肿瘤生物成像方面具有广阔的应用前景。超声分子成像具有更好的软组织结构分辨率和纵侧向探测深度[9]，将其与近红外荧光成像结合可以获得具有高肿瘤敏感性和空间分辨率的互补信号，为肿瘤的早期精准诊疗提供更丰富的信息。

光热剂的光热性能及生物相容性是实现肿瘤高效光热诊疗的关键因素[10-11]。近年来，基于 A-D-A 结构的有机小分子，因其在近红外区域具有强吸收峰被开发用于肿瘤的光学成像与光热治疗[5，12]。A-D-A 结构的有机小分子，可以通过调节给体和受体单元的结构有效调控最高占据分子轨道和最低未占据分子轨道之间的能量差，从而提高非辐射跃迁效率、增强光热转换能力[13-16]。此外，这种推－拉电子结构的分子可以诱导高效的分子内电荷转移，使其具有可延伸到近红外区域的宽吸收，且荧光量子产率低，从而可最大限度地将光能转化为热能用于光热疗法[17]。

与无机光热剂相比，有机光热剂具有明确的化学结构、良好的重复性和生物降解性，因此在临床转化方面具有很好的应用前景[18-20]。然而，非靶向的近红外分子探针对肿瘤的选择性低，可能对正常组织造成损伤，产生严重的不良反应[21]。近年来，细胞膜仿生技术成为改善光热剂生物相容性和肿瘤靶向性的重要策略[22]。肿瘤细胞膜上特定的蛋白质分子，不仅可以使纳米探针靶向同源肿瘤细胞，还可以使其逃避肝脾巨噬系统吞噬，从而提高肿瘤精准诊疗疗效[23]。因此，将具有 A-D-A 结构的有机小分子作为光热剂，通过自组装制备成近红外响应性仿生纳米探针，有望实现经近红外荧光 / 超声成像导航下的乳腺癌靶向光热治疗。

基于以上背景，此次研究通过双步乳化法将有机小分子 ITIC-4Cl 负载于聚合物纳米载体聚乳酸 / 羟基乙酸共聚物中，采用乳腺癌细胞 4T1 细胞膜 (4T1m) 对纳米颗粒进行表面修饰，同时核心负载相变材料全氟己烷 (Perfluorohexane，PFH)，构建了一种乳腺癌细胞膜仿生纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH，在体外细胞水平验证其体外近红外荧光 / 超声成像效果，并探究其对同源肿瘤细胞的靶向能力和光热治疗疗效。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 *t* 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 12 月至 2022 年 8 月在代谢性血管疾病四川省重点实验室和西南医科大学附属医院肿瘤放射生物实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 主要试剂 有机小分子 ITIC-4Cl(深圳睿迅光电材料科技有限公司)；聚乙二醇修饰的乳酸 / 羟基乙酸共聚物 (聚合比 50 ∶ 50，西安瑞禧生物科技有限公司)；聚乙烯醇 (美国 Sigma-Aldrich 公司)；PFH(北京百灵威科技有限公司)；细胞膜蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒 (上海碧云天生物技术公司)；CCK-8 细胞增殖检测试剂盒 (APExBIO，美国)。

1.3.2 主要仪器 纳米激光粒度仪 (90 Plus Zeta，Nano Brook)；透射电镜 (Talos F200X，美国)；紫外－可见－近红外分光光度计 (岛津 UV-3600Plus，日本)；荧光分光光度计 (岛津 FS5，日本)；超声波细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技有限公司)；高速冷冻离心机 (Eppendorf，德国)；热成像仪 (FLUCK，美国)；超声诊断仪 (ACUSON Sequoia，德国)；近红外Ⅱ区荧光显微成像系统 (苏州影睿光学科技有限公司)。

1.3.3 实验细胞 乳腺上皮细胞 MCF-10A，乳腺癌细胞 4T1、MCF-7、MDA-MB-231，非小细胞肺癌细胞 A549，均由西南医科大学附属医院放射分子影像实验室提供。

1.4 实验方法

1.4.1 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的制备

ITIC-4CI/PFH 的制备：取 1 mg 有机小分子 ITIC-4Cl 溶于 1 mL 二氯甲烷中备用，再利用双步乳化法制备 ITIC-4CI/PFH 纳米粒。具体步骤如下：称取 40 mg 聚乳酸 / 羟基乙酸共聚物，加入 2 mL 的二氯甲烷，常温振荡至完全溶解；加入 1 mg/mL 的 ITIC-4CI 二氯甲烷溶液，混匀；随后加入 200 μL 的 PFH，振荡数秒混匀。在冰浴条件下第一次超声乳化 (125 W，3 min，5 s，5 s)；将第一次乳化液转移至 4 mL 4% 聚乙烯醇溶液中，在相同条件下完成第二次超声乳化，然后将乳化液转移至 10 mL 的 2% 异丙醇溶液中，低温磁力搅拌 2.0–3.0 h，使二氯甲烷挥发完全；收集上述溶液，低温离心 (12 000 r/min 离心 10 min)，取沉淀，重复离心洗涤 3 次，最后得到无膜纳米粒 ITIC-4CI/PFH。所有步骤均在避光条件下进行，在聚乳酸 / 羟基乙酸共聚物二氯甲烷溶液中加入 DiI，可制备荧光标记的聚乳酸 / 羟基乙酸共聚物纳米粒。按照上述步骤制备无 PFH 的 4T1m/ITIC-4CI 纳米粒，将纳米粒置于 4 ℃避光保存。

癌细胞膜提取和 4T1m/ITIC-4CI/PFH 纳米探针的制备：收集处于对数生长期的 4T1 细胞，用预冷的 PBS 清洗培养皿 3 次后，用细胞刮刀收集细胞，4 ℃下 600×*g* 离心 5 min，取沉淀，加入含有膜蛋白提取试剂 A 和蛋白酶抑制剂 PMSF(浓度为 1×10^{-3} mol/L) 的低渗裂解缓冲液，轻轻吹打细胞，置于冰上 15 min。将细胞悬液置于液氮和室温中，反复冻融，4 ℃下 700×*g* 离心 10 min，取上清；4 ℃下 14 000×*g* 离心 30 min，所得沉淀即为癌细胞膜，置于 −80 ℃保存。将上述制备的 ITIC-4CI/PFH 与细胞膜按质量比 1 ∶ 1 混合，冰浴超声 (100 W，3 min) 后，12 000 r/min 离心 10 min，取沉淀，得到仿生纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH。采用同样的方法制备 4T1m/ITIC-4CI，4 ℃保存备用。

1.4.2 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的表征 采用透射电镜分别观察 4T1 细胞膜、ITIC-4CI/PFH、4T1m/ITIC-4CI/PFH 的形貌，激光粒度分析仪检测 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的粒径、分布及 Zeta 电位。

将纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 避光存放在 4 ℃冰箱和含体积分数 10% 血清的培养基中，于 7 d 内检测纳米探针的粒径，评价其稳定性。

采用紫外分光光度计检测游离 ITIC-4CI、聚乳酸 / 羟基乙酸共聚物纳米粒和 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的吸收光谱。

配置不同质量浓度的 ITIC-4CI 标准工作液 (12.5，6.25，3.125，1.56，0.78，0 μg/mL)，用紫外分光光度计测定 ITIC-4CI 最大吸收波长处的吸光度值，绘制标准曲线，计算 4T1m/ITIC-4CI/PFH 中 ITIC-4CI 的包封率及载药量。

采用荧光分光光度计检测 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的荧光光谱，分析其光物理性质。

采用凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 检测 4T1m/ITIC-4CI/PFH 表面膜蛋白图谱，验证癌细胞膜是否包被成功。

1.4.3 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 体外细胞摄取和同源靶向性检测 当 4T1 细胞处于对数生长期时，以 1×10^5/ 孔的密度接种于培养皿，于 37 ℃、体积分数 5%CO_2 培养箱中孵育 24 h 后，将 DiI 标记的 ITIC-4CI/PFH 和 4T1m/ITIC-4CI/PFH 分别加入到培养皿中，孵育 0.5，1，2，3 h，去掉培养基，终止孵育。用 PBS 洗 3 遍，加入 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min，PBS 清洗 3 遍；加入适量的 DAPI 染色 10 min；PBS 清洗 3 遍，在荧光显微镜下观察细胞摄取情况。

将 4T1m/ITIC-4CI/PFH 分别与 MCF-7 细胞、MDA-MB-231 细胞、A549 细胞孵育 3 h，采用上述同样步骤进行染色，荧光显微镜下观察并采集图像。

1.4.4 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 体外近红外Ⅱ区荧光 / 超声成像 将不同质量浓度 (0，0.03，0.06，0.125，0.5，1 mg/mL) 的 4T1m/ITIC-4CI/PFH 分别避光加入 96 孔板中，200 μL/ 孔，在 880 nm 激发下观察不同质量浓度纳米探针的近红外Ⅱ区荧光成像效果并对荧光强度进行定量分析。

将不同质量浓度 (0，0.125，0.25，0.5，1 mg/mL) 的 4T1m/ITIC-4CI/PFH 加入到琼脂糖凝胶模型中，在 660 nm 激光照射下 (1 W/cm^2) 观察超声二维模式和增强模式显像效果，应用 Image J 软件进行定量分析。激光照射前后，光镜下观察纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH(1 mg/mL) 的相变情况。

1.4.5 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 体外光热性能及光热稳定性评估 用 660 nm 激光 (1 W/cm^2) 照射不同质量浓度 4T1m/ITIC-4CI/PFH 溶液 10 min，热像仪记录溶液的温度变化；然后固定溶液质量浓度 (0.5 mg/mL)，采用不同功率密度激光照射 10 min 并记录温度变化。

为了研究 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的光热转换能力和光热稳定性，将纳米粒溶液 (0.5 mg/mL) 加热、冷却循环 5 次，热像仪实时记录溶液温度变化，最后获得温升和降温曲线。

1.4.6 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 体外光热治疗效果评估 首先，采用 CCK-8 检测纳米探针对 MCF-10A 和 4T1 细胞的细胞毒性。当 MCF-10A 细胞、4T1 细胞处于对数生长期且细胞长至 80%–90% 时，使用计数板计数，用新鲜的完全培养基调整细胞悬液浓度；将 MCF-10A 细胞和 4T1 细胞按 (6–8)×10^3/ 孔的密度接种于 96 孔板，在培养箱中孵育 24 h 后，实验组加入含有不同质量浓度 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的新鲜培养基，放入培养箱中培养。孵育 24 h 后，以换液形式将含有 10%CCK-8 的培养基加入每孔，孵育 1 h 后，用酶标仪记录 450 nm 处的吸光度值，计算细胞存活率。细胞存活率 =(实验组吸光度值 − 空白组吸光度值)/(对照组吸光度值 − 空白组吸光度值)×100%，对照组未加入 4T1m/ITIC-4CI/PFH，空白组未加入 4T1m/ITIC-4CI/PFH 与细胞。

将 4T1 细胞以 (6–8)×10^3/ 孔的密度接种于 96 孔板，在 37 ℃、体积分数 5%CO_2 培养箱中孵育过夜，分为对照组、单激光组、4T1m/ITIC-4CI/PFH 组、4T1m/ITIC-4CI+ 激光组、ITIC-4CI/PFH+ 激光组、4T1m/ITIC-4CI/PFH+ 激光组。将不同组分纳米探针与 4T1 细胞共同孵育 4 h 后，各激光组予以激光照射 (1 W/cm^2，5 min)，采用 CCK-8 法测定各组细胞存活率；用钙黄绿素和碘化丙啶染色，在荧光显微镜下观察细胞的存

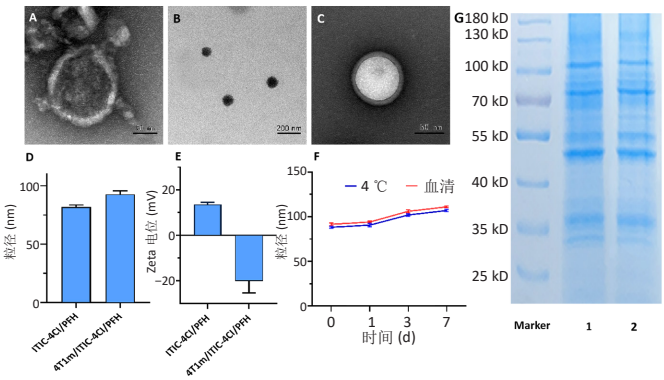
活状态。

1.5 主要观察指标 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的体外同源靶向能力及其增强近红外Ⅱ区荧光 / 超声显像和光热治疗效果。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism v9.0.0 软件进行统计学分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 t 检验，两变量之间关系采用线性相关分析；计数资料以百分比表示；$P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。统计学方法已经西南医科大学附属医院统计学老师刘军祥审核。

2 结果 Results

2.1 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的表征结果 透射电镜下可见，纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 呈球形，大小均一，分散性好，表面包覆的细胞膜清晰可见，说明细胞膜修饰成功，见**图 1A–C**。激光粒度分析仪检测显示，经癌细胞膜包被后的纳米探针平均粒径为 (92.7±2.3) nm，见**图 1D**；表面电位为 (−20.19±4.2) mV，见**图 1E**。于 4 ℃和血清中存放 7 d 后，纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 粒径未见明显变化，见**图 1F**。纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的平均包封率为 (67.81±1.42)%，平均载药量为 (4.49±0.13)%。凝胶电泳检测结果显示纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 和 4T1 细胞膜具有相似的蛋白图谱，见**图 1G**。

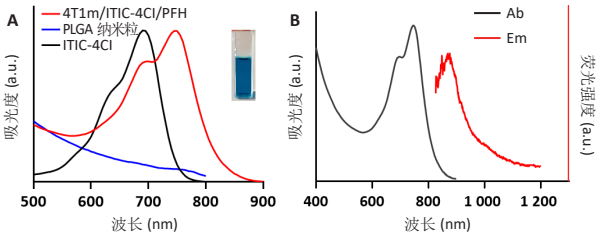


图注：A、B、C 分别为 4T1 细胞膜、ITIC-4CI/PFH、4T1m/ITIC-4CI/PFH 透射电镜观察结果，标尺分别为 50，200，50 nm，4T1m/ITIC-4CI/PFH 单个分散，呈球形，大小均一，分散性好；D 为 4T1m/ITIC-4CI/PFH 包膜前后粒径变化图，平均粒径为 (92.7±2.3) nm；E 为 4T1m/ITIC-4CI/PFH 包膜前后电位变化图，平均电位为 (−20.19±4.2) mV；F 为 4T1m/ITIC-4CI/PFH 在 4 ℃及血清中的粒径检测结果，7 d 后其粒径未见明显变化；G 为凝胶电泳检测结果，1、2 分别为 4T1 细胞膜和纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH，二者具有相似的蛋白图谱

图 1 | 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的基本表征

Figure 1 | Basic characterization of 4T1m/ITIC-4CI/PFH nanoprobe

2.2 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的吸收和发射光谱 紫外 – 可见光吸收光谱检测结果显示，空白的聚乳酸 / 羟基乙酸共聚物纳米粒溶液在 500–900 nm 无明显吸收峰，ITIC-4CI 二氯甲烷溶液在 500–900 nm 的最大吸收峰位于 690 nm 附近，而 4T1m/ITIC-4CI/PFH 水溶液最大吸收峰位于 745 nm 附近，吸收光谱发生红移，见**图 2A**。荧光光谱检测显示，4T1m/ITIC-4CI/PFH 水溶液发射光谱荧光峰中心位于 876 nm 附近，托尾可延伸至近红外Ⅱ区，说明其具有近红外Ⅱ区荧光成像的潜力，见**图 2B**。

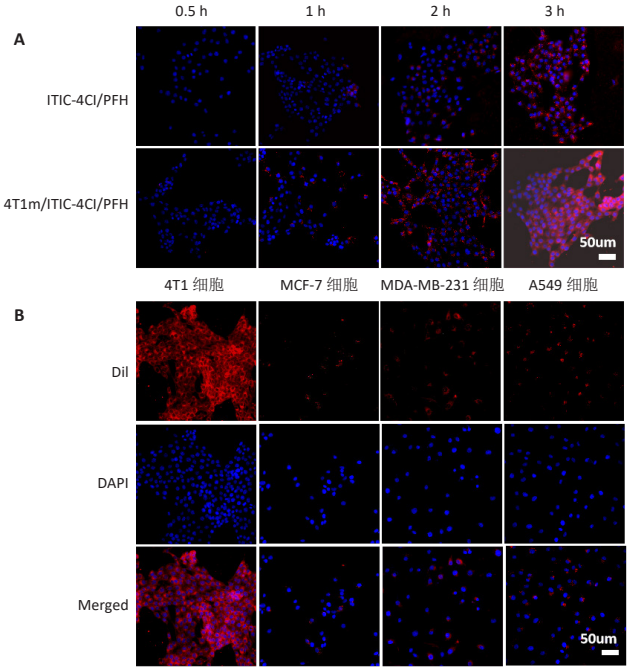


图注：A 为 4T1m/ITIC-4CI/PFH、ITIC-4CI、聚乳酸 / 羟基乙酸共聚物 (PLGA) 纳米粒的吸收光谱，ITIC-4CI 吸收峰位于 690 nm 附近，经细胞膜修饰的 4T1m/ITIC-4CI/PFH 最大吸收峰位于 745 nm 附近，4T1m/ITIC-4CI/PFH 最大吸收峰发生了红移；B 为 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的吸收光谱 (Ab) 和荧光发射光谱 (Em)，荧光峰中心位于 876 nm 附近，托尾延伸至近红外Ⅱ区

图 2 | 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的紫外吸收光谱和荧光光谱

Figure 2 | Ultraviolet absorption and fluorescence spectra of 4T1m/ITIC-4CI/PFH nanoprobes

2.3 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的同源靶向能力 如**图 3A** 所示，DiI 标记的纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 和 ITIC-4CI/PFH 分别与 4T1 细胞孵育不同时间，孵育 3 h 后可见 4T1 细胞对 4T1m/ITIC-4CI/PFH 有明显摄取。然后，将纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 分别与 4T1 细胞、MCF-7 细胞、MDA-MB-231 细胞、A549 细胞共孵育 3 h，荧光显微镜下观察到 4T1 细胞荧光强度最高，证实了 4T1m/ITIC-4CI/PFH 可以特异性结合 4T1 细胞，具有同源靶向能力，见**图 3B**。



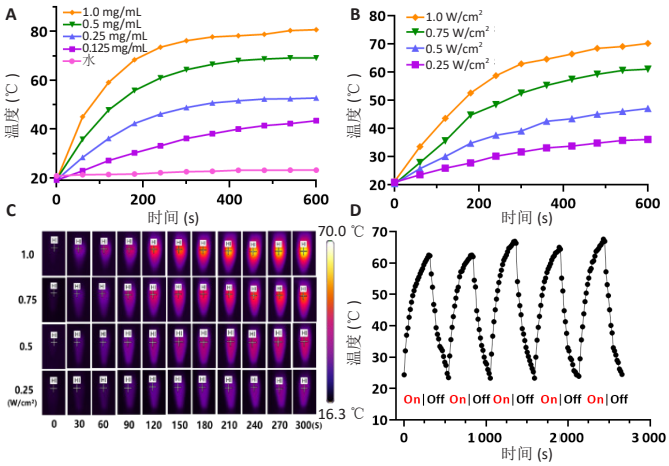
图注：A 为 4T1m/ITIC-4CI/PFH 和 ITIC-4CI/PFH 与 4T1 细胞孵育不同时间的细胞摄取图，孵育 3 h 后，4T1 细胞对 4T1m/ITIC-4CI/PFH 有明显摄取，细胞内可见明显红色荧光；B 为 4T1m/ITIC-4CI/PFH 和不同细胞孵育 3 h 的靶向结合情况，4T1 细胞组可见显著红色荧光 (蓝色为 DAPI 染色的细胞核，红色为 DiI 标记的纳米颗粒)，标尺为 50 μm

图 3 | 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的同源靶向性验证

Figure 3 | Homologous targeting verification of 4T1m/ITIC-4CI/PFH nanoprobes

2.4 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的光热性能及光热稳定性 在激光 (1 W/cm^2) 照射下，溶液温度随纳米探针质量浓度的增加而升高，呈浓度依赖性，见**图 4A**。固定纳米探针质量浓

度 (0.5 mg/mL) 后，溶液温度随着激光功率密度的增加而升高，红外热像仪记录了不同功率照射时的热成像图，见**图 4B、C**。光热稳定性检测结果显示，4T1m/ITIC-4CI/PFH 在 660 nm 激光连续加热 / 冷却循环 5 次后仍保持良好的光热转换能力，表明 4T1m/ITIC-4CI/PFH 具有优异的光热稳定性，见**图 4D**。



图注：A 为不同质量浓度的纳米探针溶液在激光照射下 (1 W/cm²) 的温度变化曲线，溶液温度随样品质量浓度增加而升高；B 为纳米探针 (0.5 mg/mL) 在不同激光功率密度照射下的温度变化曲线，随着照射激光功率密度增加，溶液温度上升越明显；C 为不同功率激光功率密度照射下纳米探针 (0.5 mg/mL) 的红外热成像图；D 为 5 次加热 / 冷却循环下纳米探针 (0.5 mg/mL) 的温度变化曲线，5 次循环后仍保持良好的光热转换能力，具有优异的光热稳定性

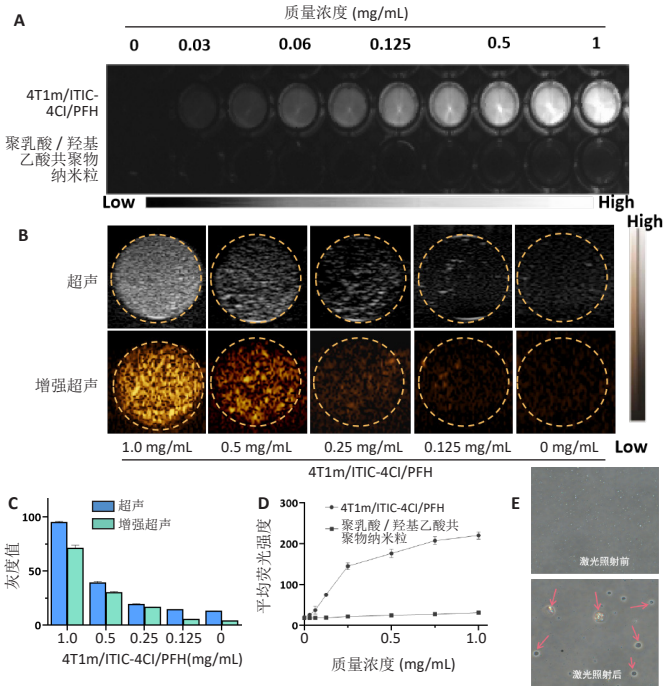
图 4 ｜纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的光热性能评估

Figure 4 ｜ Evaluation of the photothermal properties of 4T1m/ITIC-4CI/PFH nanoprobes

2.5 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的体外近红外荧光成像 / 超声成像 在 880 nm 激光照射下，不同质量浓度 (0，0.03，0.06，0.125，0.5，1 mg/mL) 的 4T1m/ITIC-4CI/PFH 溶液发出明显的近红外 II 区荧光信号，随着纳米探针质量浓度的增加，荧光信号更明显，见**图 5A、D**。在体外超声成像中，经激光辐照后，二维模式和超声增强模式下都可见纳米探针明显的信号增强，超声信号强度的变化呈纳米探针质量浓度依赖性，见**图 5B、C**。激光照射前后，光镜下观察到纳米探针发生相变，形成不同大小微气泡，见**图 5E**。

2.6 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的体外细胞毒性实验 如**图 6A、B** 所示，无激光照射时，不同质量浓度的纳米粒与 MCF-10A 细胞、4T1 细胞共孵育 24 h 后，在较高治疗浓度下 (1.25 mg/mL) 细胞存活率仍保持在 90% 以上，说明该纳米粒具有良好的生物相容性。

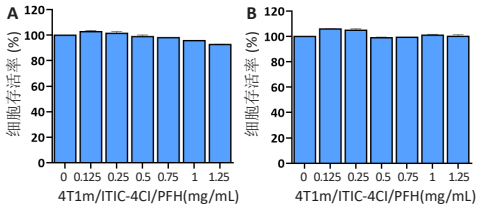
2.7 纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的体外光热治疗效果 钙黄绿色 / 碘化丙啶活死染色结果显示，单激光组和 4T1m/ITIC-4CI/PFH 组均未见明显红色荧光，ITIC-4CI/PFH+ 激光组细胞可见较少红色荧光，4T1m/ITIC-4CI + 激光组可见部分红色荧光，4T1m/ITIC-4CI/PFH+ 激光组可见明显红色荧光，细胞杀伤效果最显著，见**图 7A**。4T1 细胞与不同组分的纳米粒共孵育 4 h 后，4T1m/ITIC-4CI/PFH+ 激光组表现出明显的细胞杀伤效果，见**图 7B**。



图注：A 为不同质量浓度 4T1m/ITIC-4CI/PFH 和空白聚乳酸 / 羟基乙酸共聚物纳米粒的近红外 II 区荧光图像，激光照射下 4T1m/ITIC-4CI/PFH 发出明显的近红外 II 区荧光信号，且随着纳米粒质量浓度的增加，荧光信号更明显；B 为不同质量浓度 4T1m/ITIC-4CI/PFH 溶液二维超声模式和增强超声模式的超声信号强度变化图，超声信号强度变化呈质量浓度依赖性；C 为图 B 超声信号强度定量分析；D 为图 A 平均荧光强度定量分析；E 为激光辐照前后 4T1m/ITIC-4CI/PFH 光镜图，激光照射后纳米探针发生相变，形成不同大小微气泡，箭头示 (×800)

图 5 ｜纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的体外近红外 II 区荧光成像 / 超声成像

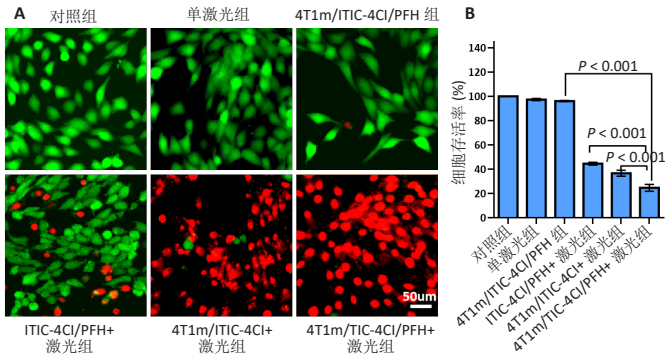
Figure 5 ｜ Near-infrared-II fluorescence imaging/ultrasound imaging of 4T1m/ITIC-4CI/PFH nanoprobes *in vitro*



图注：A、B 分别为不同质量浓度的 4T1m/ITIC-4CI/PFH 对 MCF-10A、4T1 细胞毒性检测结果，细胞存活率均保持在 90% 以上

图 6 ｜纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的体外细胞毒性实验

Figure 6 ｜ Cytotoxicity of 4T1m/ITIC-4CI/PFH nanoprobes *in vitro*



图注：A 为乳腺癌细胞 4T1 与不同组分纳米粒共孵育 4 h 后的钙黄绿色 / 碘化丙啶活死染色结果，活细胞呈绿色，死细胞呈红色，标尺为 50 μm；B 为 CCK-8 法测定各组细胞存活率

图 7 ｜纳米探针 4T1m/ITIC-4CI/PFH 的体外光热治疗效果

Figure 7 ｜ Photothermal effect of 4T1m/ITIC-4CI/PFH nanoprobes *in vitro*

3 讨论 Discussion

光热治疗被认为是近年来癌症治疗的重大突破，通过非电离、非侵入性光照射可实现肿瘤局部热消融[24]。分子成像技术，包括计算机断层扫描、磁共振、核医学成像、超声成像和光学成像[25-29]，已被用于非侵入性的肿瘤早期诊断[30]。将近红外Ⅱ区荧光成像与超声成像结合，可以实现肿瘤实时成像，为肿瘤的早期诊断和实时监测光热治疗疗效提供一种潜在新策略[31]。

ITIC-4Cl 是一种低带 A-D-A 结构分子，其独特的分子结构使其自组装后形成的纳米探针表现出优异的光物理特性，在其光物理性质研究中发现，游离的 ITIC-4Cl 在 690 nm 处具有很强的吸收峰。纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 在 PBS 中具有与游离 ITIC-4Cl 相似的特征吸收峰，但吸收峰红移至 745 nm 附近。此外，纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 的最大发射峰位于 876 nm 附近，并具有延伸到近红外Ⅱ区的尾部发射，这可能是由于 A-D-A 结构分子端基的强吸电子能力和大稠环共轭核的供电子能力促进了分子内电荷转移，从而使吸收光谱和荧光发射光谱向近红外区域移动[16, 32]。利用纳米探针在溶液中优异的光学性质，进一步验证其荧光成像性能发现，在 880 nm 激光照射下，纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 在 PBS 中可发出明亮的近红外Ⅱ区荧光信号，随着纳米探针质量浓度的增加，荧光信号逐渐增强。因此，4T1m/ITIC-4Cl/PFH 是一种具有近红外Ⅰ区吸收和近红外Ⅱ区尾部发射的近红外纳米探针，具有近红外Ⅱ区荧光成像和高效光热治疗的潜力。

光热纳米的光热性能和热稳定性是临床应用的重要参数。基于 A-D-A 结构分子 ITIC 的纳米粒子，已被证实在 660 nm 激光照射下具有光热治疗效应，在体外具有高的光热转换效率 (≈41.6%)[33]，其衍生物 ITIC-4Cl 具有更低的光学带隙 (1.48 eV) 和更好的电子传输能力[34]，是一种理想的光热剂。纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 在 660 nm 激光照射下温度变化呈浓度、功率依赖性；同时，纳米探针在 5 个照射周期表现出优异的光热稳定性和光热转换能力。此外，纳米探针在近红外激光照射下可发生相变，实现增强超声显像的功能，其潜在机制可能与纳米探针发生相变后转化为微气泡，与周围环境产生声阻抗差异，从而增强背向散射，实现增强超声对比显影[35]。结果表明，纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 具有良好的光热性能和增强超声显像的能力。

癌细胞膜的包覆可以改善纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 的生物相容性并赋予其同源靶向能力。4T1 细胞表面具有转铁蛋白抗原、上皮细胞黏附分子、CD44 和 CD47 等细胞黏附分子[36-37]，这些黏附分子 (转铁蛋白抗原、CD44 和 CD47) 在细胞黏附中发挥了重要的作用，通过特异性识别黏附分子实现源细胞特异性靶向，基于这些膜蛋白的同源结合机制，从而可以实现纳米探针与肿瘤细胞之间的特异性识别和结合。此次研究通过双步乳化法和超声法成功制备了 4T1 细胞膜包被的多功能纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH，经 4T1 细胞膜修饰后其粒径为 (92.7±2.3) nm，尺寸均一、稳定性良好。制备的纳米探针与 4T1 细胞膜具有相似的蛋白图谱，因而可以通过同源靶向结合机制，主动靶向同源肿瘤细胞[38]。此外，在体外同源靶向性实验中发现，4T1 细胞组对包覆同源 4T1 细胞膜的纳米探针摄取率和荧光强度更高，进一步证实了纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 与同源 4T1 细胞的特异性结合能力。因此，纳米探针 4 T1m/ITIC-4Cl/PFH 可以主动靶向同源 4T1 细胞，有助于提高肿瘤成像效果和光热治疗疗效。

良好的生物安全性和肿瘤靶向性有助于实现安全高效的光热治疗。在体外细胞毒性实验中，纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 对 4T1 细胞和 MCF-10A 细胞均无明显的细胞毒性，细胞存活率大于 90%，且单激光照射或 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 处理的 4T1 细胞生长无明显抑制，说明 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 具有良好的生物相容性。相比之下，激光辐照时 ITIC-4Cl/PFH 组、4T1m/ITIC-4Cl/PFH 组表现出明显的细胞抑制作用，4T1m/ITIC-4Cl/PFH 联合激光处理时热疗效果更为显著，说明纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 的同源靶向作用促进了对肿瘤细胞的选择性杀伤效应。4T1m/ITIC-4Cl+ 激光组对 4T1 细胞的杀伤效果弱于 4T1m/ITIC-4Cl/PFH+ 激光组，但强于 ITIC-4Cl/PFH+ 激光组，这可能是激光照射下 ITIC-4Cl 的光热效应促使 4T1m/ITIC-4Cl/PFH 纳米探针发生液气相变，转化为微泡，相变时的空化效应、机械破坏作用使细胞膜通透性增强[39-40]，纳米探针更容易进入肿瘤细胞，从而协同增强光热治疗疗效。以上结果表明，4T1m/ITIC-4Cl/PFH 纳米探针具有良好的生物相容性和体外靶向治疗效果，是一种有前途的肿瘤光疗制剂。

综上所述，研究成功制备了一种新型近红外仿生纳米探针 4T1m/ITIC-4Cl/PFH，在体外验证了其近红外荧光 / 超声成像效果，探究了其同源靶向能力和光热治疗效果。研究首次通过双步乳化法将 A-D-A 结构的有机小分子 ITIC-4Cl 负载于聚乳酸 / 羟基乙酸共聚物纳米粒中，使 ITIC-4Cl 的水溶性和生物相容性得到改善，且在 PBS 中表现出优异的近红外Ⅱ荧光成像能力和光热性能。此外，经 4T1 细胞膜修饰的纳米探针既避免了繁琐的基团修饰工程，又实现了纳米探针与肿瘤细胞之间的特异性识别和结合，提高了对肿瘤的同源靶向性和光热治疗效果。因此，研究为新型纳米探针的制备及双模态成像导航下乳腺癌精准诊疗提供了一种新策略，但纳米探针在体内的生物安全性、分布及光热治疗疗效仍需进一步验证。

作者贡献：王文渊、夏纪筑负责实验设想，李文兰设计并完成了实验，张玉佩、杨小燕负责归纳整理数据，任文秀、王志刚对文章提出了建设性意见，李文兰负责撰写文章。

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：该研究遵守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] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-249.
[2] LIU M, ANDERSON R, LAN X, et al. Recent advances in the development of nanoparticles for multimodality imaging and therapy of cancer. Med Res Rev. 2020;40(3):909-930.
[3] YAN D, WANG M, WU Q, et al. Multimodal imaging-guided photothermal immunotherapy based on a versatile nir-ii aggregation-induced emission luminogen. Angew Chem Int Ed Engl. 2022;61(27):e202202614.
[4] LIU Y, BHATTARAI P, DAI Z, et al. Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer. Chem Soc Rev. 2019;48(7):2053-2108.
[5] CHANG T, QIU Q, JI A, et al. Organic single molecule based nano-platform for nir-ii imaging and chemo-photothermal synergistic treatment of tumor. Biomaterials. 2022;287:121670.
[6] JI Y, JONES C, BAEK Y, et al. Near-infrared fluorescence imaging in immunotherapy. Adv Drug Deliv Rev. 2020;167:121-134.
[7] LI L, DONG X, LI J, et al. A short review on nir-ii organic small molecule dyes. Dyes Pigments 2020;183:108756.
[8] LI JB, LIU HW, FU T, et al. Recent progress in small-molecule near-ir probes for bioimaging. Spec. Issue Part Two Big Quest Chem. 2019; 1(2):224-234.
[9] 孙阳，王志刚. 多功能超声造影剂分子显像与治疗研究进展 [J]. 中国超声医学工程学会，2012,28(1):84-86.
[10] CUI T, YAN Z, QIN H, et al. A sequential target-responsive nanocarrier with enhanced tumor penetration and neighboring effect in vivo. Small. 2019;15(42):1903323.
[11] DOAN VHM, NGUYEN VT, MONDAL S, et al. Fluorescence/photoacoustic imaging-guided nanomaterials for highly efficient cancer theragnostic agent. Sci Rep. 2021;11(1):15943.
[12] PATIL Y, MISRA R. Rational molecular design towards nir absorption: efficient diketopyrrolopyrrole derivatives for organic solar cells and photothermal therapy. J Mater Chem C. 2019;7(42):13020-13031.
[13] JIA S, LI Z, SHAO J, et al. Acceptor regulation of acceptor–donor–acceptor type conjugated oligomer for photothermal combating of resistant bacteria. ACS Appl Polym Mater. 2022;4(8):5275-5280.
[14] LI B, GAN Y, YANG K, et al. Acceptor-donor-acceptor structured phototheranostics for near-infrared ii fluorescent and photoacoustic imaging-guided photodynamic and photothermal synergistic therapy. Sci Chin Mater. 2022;66:385-396.
[15] WAN Y, LU G, WEI WC, et al. Stable organic photosensitizer nanoparticles with absorption peak beyond 800 nanometers and high reactive oxygen species yield for multimodality phototheranostics. ACS Nano. 2020;14(8):9917-9928.
[16] ZHANG Y, SHI M, YAN Z, et al. Ultrastable near-infrared nonlinear organic chromophore nanoparticles with intramolecular charge transfer for dually photoinduced tumor ablation. Adv Healthc Mater. 2020;9(20):2001042.
[17] HE Z, ZHAO L, ZHANG Q, et al. An acceptor–donor–acceptor structured small molecule for effective nir triggered dual phototherapy of cancer. Adv Funct Mater. 2020;30(16):1910301.
[18] JUNG HS, VERWILST P, SHARMA A, et al. Organic molecule-based photothermal agents: an expanding photothermal therapy universe. Chem Soc Rev. 2018;47(7):2280-2297.
[19] LI S, DENG Q, ZHANG Y, et al. Rational design of conjugated small molecules for superior photothermal theranostics in the nir-ii biowindow. Adv Mater. 2020;32(33):2001146.
[20] LI L, HAN X, WANG M, et al. Recent advances in the development of near-infrared organic photothermal agents. Chem Eng J. 2021;417:128844.
[21] LI H, KIM Y, JUNG H, et al. Near-infrared (nir) fluorescence-emitting small organic molecules for cancer imaging and therapy. Chem Soc Rev. 2022;51(21):8957-9008.
[22] ZHEN X, CHENG P, PU K. Recent advances in cell membrane–camouflaged nanoparticles for cancer phototherapy. Small. 2019;15(1):1804105.
[23] FANG RH, HU CMJ, LUK BT, et al. Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery. Nano Lett. 2014;14(4):2181-2188.
[24] WANG Q, XIA B, XU J, et al. Biocompatible small organic molecule phototheranostics for nir-ii fluorescence/photoacoustic imaging and simultaneous photodynamic/photothermal combination therapy. Mater Chem Front. 2019;3(4):650-655.
[25] OZERSKAYA AV, ZAMAY TN, KOLOVSKAYA OS, et al. 11C-radiolabeled aptamer for imaging of tumors and metastases using positron emission tomography- computed tomography. Mol Ther Nucleic Acids. 2021;26:1159-1172.
[26] ZIMMER WD, BERQUIST TH, MCLEOD RA, et al. Bone tumors: magnetic resonance imaging versus computed tomography. Radiology. 1985; 155(3):709-718.
[27] WANG G, SONG L, HOU X, et al. Surface-modified gvs as nanosized contrast agents for molecular ultrasound imaging of tumor. Biomaterials. 2020;236:119803.
[28] ZHANG L, LIU Y, HUANG H, et al. Multifunctional nanotheranostics for near infrared optical imaging-guided treatment of brain tumors. Adv Drug Deliv Rev. 2022;190:114536.
[29] PATHAK V, NOLTE T, RAMA E, et al. Molecular magnetic resonance imaging of alpha-v-beta-3 integrin expression in tumors with ultrasound microbubbles. Biomaterials. 2021;275:120896.
[30] 甘甜，王文渊，晏殊瑾，等. 携载 LXR 激动剂近红外光响应性纳米粒的光热协同免疫效应 [J]. 中国组织工程研究，2023,27(12):1863-1869.
[31] ZHANG C, LIU J, GUO H, et al. Theranostic nanomedicine carrying l-menthol and near-infrared dye for multimodal imaging-guided photothermal therapy of cancer. Adv Healthc Mater. 2019;8(16):1900409.
[32] LI S, DENG Q, ZHANG Y, et al. Rational design of conjugated small molecules for superior photothermal theranostics in the nir-ii biowindow. Adv Mater. 2020;32(33):2001146.
[33] CAI Y, WEI Z, SONG C, et al. Novel acceptor–donor–acceptor structured small molecule-based nanoparticles for highly efficient photothermal therapy. Chem Commun. 2019;55(61):8967-8970.
[34] WAN X, LI C, ZHANG M, et al. Acceptor–donor–acceptor type molecules for high performance organic photovoltaics – chemistry and mechanism. Chem Soc Rev. 2020;49(9):2828-2842.
[35] 黄建波，杨林，阳锐，等. 岩藻多糖修饰的相变型造影剂体外超声显像及靶向肝癌的实验研究 [J]. 四川大学学报 (医学版),2022, 53(5):752-757.
[36] PEI X, PAN X, XU X, et al. 4T1 cell membrane fragment reunited pamam polymer units disguised as tumor cell clusters for tumor homotypic targeting and anti-metastasis treatment. Biomater. Sci. 2021;9(4):1325-1333.
[37] LI H, LIU Y, HUANG B, et al. Highly efficient gsh-responsive “off–on” nir-ii fluorescent fenton nanocatalyst for multimodal imaging-guided photothermal/chemodynamic synergistic cancer therapy. Anal Chem. 2022;94(29):10470-10478.
[38] ZHU L, ZHONG Y, WU S, et al. Cell membrane camouflaged biomimetic nanoparticles: focusing on tumor theranostics. Mater Today Bio. 2022; 14:100228.
[39] 王红卫，卓忠雄，赵延新，等. 超声辐照瘤内注射微泡空化效应的病理学研究 [J]. 中国超声医学杂志，2007(4):256-258.
[40] 周裕卿，彭玉兰，杨林，等. 全氟化碳纳米粒在超声分子成像和治疗中的应用 [J]. 中国医学影像学杂志，2022,30(5):514-517.

(责任编辑：GW，ZN，QY，LJY)