

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002098

载吖啶菁绿与阿霉素靶向纳米粒用于视网膜母细胞瘤体外成像的实验研究

黎 梦¹, 周 宇¹, 邹宏密¹, 王志刚², 周希媛¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院眼科, 重庆 400010; 2. 重庆市超声影像学研究所, 重庆 400010)

【摘要】目的:制备一种靶向叶酸受体的载吖啶菁绿(indocyanine green, ICG)及阿霉素(adriamycin, ADM)的相变型多功能脂质纳米粒(ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM)并研究其基本性质,检测其靶向能力、光热效应、超声及光声双模态显像能力,为视网膜母细胞瘤的诊断提供新策略。**方法:**采用双乳化法制备 ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM 纳米粒,透射电镜观察纳米粒形态,马尔文粒径分析仪检测粒径及电位,紫外分光光度计检测纳米粒的包封率、载药量;流式细胞术量化及激光共聚焦显微镜下观察纳米粒表面叶酸表达情况和体外寻靶能力;CCK-8 法检测 ICG/FA/Pct-PFPNP 纳米粒的生物安全性;近红外激光(808 nm)激发 ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM 纳米粒,检测其超声/光声双模态显像能力。**结果:**成功制备了 ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM 纳米粒,其外观呈球形,平均粒径为(374.40 ± 23.48) nm,平均电位(-28.0 ± 4.5) mV。测得 ICG 包封率为(91.85 ± 2.98)%,载药量为(9.19 ± 0.29)%; ADM 包封率为(62.04 ± 5.10)%,载药量为(6.20 ± 0.51)%。流式细胞术和激光共聚焦显微镜结果均显示纳米粒表面叶酸表达情况良好,靶向组与 Y79 细胞连接率为(96.57 ± 3.17)%,与非靶向组、抗体封闭组相比差异具有统计学意义($F=1537.6, P<0.05$)。CCK-8 结果显示 ICG/FA/Pct-PFPNP 纳米粒没有明显的细胞毒性。ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM 纳米粒经激光辐照后能发生液气相变,增强超声显影并能使局部温度上升至 60.8 ℃。光声信号随纳米粒浓度升高而增强,具有良好的线性关系。**结论:**成功制备了载吖啶菁绿与阿霉素的靶向相变型纳米粒,其靶向能力好,光热效应佳,增强超声及光声显像效果好,可以用于视网膜母细胞瘤的诊断。

【关键词】视网膜母细胞瘤;吖啶菁绿;脂质纳米粒;液气相变;超声分子成像

【中图分类号】R739.72

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-12-19

Application of nanoparticle loaded with indocyanine green and adriamycin in *in vitro* imaging of retinoblastoma: An experimental studyLi Meng¹, Zhou Yu¹, Zou Hongmi¹, Wang Zhigang², Zhou Xiyuan¹

(1. Division of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To prepare the phase-change multifunctional lipid nanoparticle containing indocyanine green(ICG) and adriamycin (ADM) and targeting folate receptor (ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM), to investigate its basic properties, targeting ability, photothermal effect, and ultrasonic/photoacoustic bimodal imaging ability, and to provide new strategies for the diagnosis of retinoblastoma. **Methods:** ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM nanoparticles were prepared by the double emulsification method. A transmission electron microscope was used to observe the morphology of nanoparticles, the Malvern particle size analyzer was used to measure particle size and electric potential, and an ultraviolet spectrophotometer was used to measure the encapsulation efficiency and drug loading rate of nanoparticles. Flow cytometry and confocal laser scanning were used to observe the expression of folic acid on the surface of ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM nanoparticles and targeting ability in vitro. CCK-8 assay was used to evaluate the biosafety of nanoparticles. Near-infrared laser(808 nm) was used to excite ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM nanoparticles and assess their ultrasonic/photoacoustic bimodal imaging ability. **Results:** ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM nanoparticles were successfully prepared, with a spherical appearance, an average

作者介绍: 黎 梦, Email: 394770164@qq.com,

研究方向: 眼底病。

通信作者: 周希媛, Email: zhouxiyuan2002@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81501487、81170858)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190430.0852.002.html>

(2019-05-05)

particle size of (374.40 ± 23.48) nm, and an average potential of (-28.0 ± 4.5) mV. The encapsulation efficiency and drug loading rate of ICG were (91.85 ± 2.98)% and (9.19 ± 0.29)%, respectively, and the encapsulation efficiency and drug loading rate of ADM were (62.04 ± 5.10)% and (6.20 ± 0.51)%, respec-

tively. Both flow cytometry and laser confocal microscopy showed good expression of folic acid on the surface of the nanoparticles; the targeted group had a Y79 cell connection rate of $(96.57 \pm 3.17)\%$, which was significantly different from that in the non-targeted group and the antibody blocking group ($F=1537.6, P<0.05$). The CCK-8 assay showed no obvious cytotoxicity of ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM nanoparticles. The ICG/FA/Pct-PFPNP; ADM nanoparticles showed liquid-gas phase transition after laser irradiation, enhanced ultrasound imaging, and increased local temperature ($60.8\text{ }^{\circ}\text{C}$). The intensity of photoacoustic signal increased with the increase in nanoparticle concentration, and there was a good linear relationship between nanoparticle concentration and signal intensity.

Conclusion: The phase-change nanoparticles loaded with ICG and ADM were successfully prepared, with good targeting ability and photothermal effect. Such nanoparticles can enhance the quality of ultrasonic/photoacoustic imaging. Therefore, it can be used in the diagnosis of retinoblastoma.

【Key words】 retinoblastoma; indocyanine green; lipid nanoparticle; liquid-gas phase transition; ultrasound molecular imaging

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是婴幼儿最常见的眼内恶性肿瘤^[1],其发病率达 1:15 000~1:20 000^[2],其恶性程度高,占儿童致盲原因的 4%^[3]。目前国内 RB 患儿的生存率为 63%^[4],明显低于发达国家的 95%^[5-6],造成这一差距的主要原因是我国患儿多由“白瞳症”就诊,此时已进入严重危害视力甚至生命的时期。因此,能否早期特异性诊断 RB 显得尤为重要。近年来,超声分子显像与治疗技术因其无创、简便、靶向性好等优势被广泛运用到乳腺癌、肝癌等多种肿瘤的研究中^[7-8],有望成为肿瘤诊断的主流方式。这些优势也为配合能力较差的婴幼儿在肿瘤诊断与治疗方面带来了极大的临床应用前景。

现代医学各种影像学技术各具特色,但单一的某个技术并不能对肿瘤组织进行完整的描述。多个成像技术相结合组成的多模态成像系统能获得肿瘤组织的更多信息,为提高肿瘤的早期诊断率提供了强有力的基础。吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)是经 FDA 批准运用于临床的染料,也是眼科常用的造影剂,由于其在近红外处的吸光能力极强^[9],使其具有良好的光热转换能力,从而在光声成像和光热治疗领域得到了极为广泛的应用^[10]。全氟戊烷(perfluoropentane, PFP)是一种具有液气相变能力的液态氟碳^[11],在温度、激光、声波等条件改变下能发生相变,主要被用于超声造影等影像技术^[12]。

因此,本研究以 RB 细胞表面高表达的叶酸受体^[13-14]为靶点,利用类脂为载体材料,携 PFP、光敏剂 ICG 及化疗药物阿霉素(adriamycin, ADM),利用光致相变及光热效应原理^[15],制备一种直接靶向 RB 细胞并实现超声/光声双模态分子显像的脂质纳米粒,并通过一系列实验评价其靶向显像能力,有望为早期、安全、无创诊断 RB 提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, 美国 Sigma 公司);叶酸修饰的磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000-Folate, 美国 Avanti 公司);胆固醇(Chol, 生工生物工程(上海)股份有限公司);盐酸阿霉素(ADM, 北京百灵威科技有限公司);吲哚菁绿(ICG, 成都艾科达化学试剂有限公司);全氟戊烷(PFP, 美国 Sigma 公司);三氯甲烷(Chloroform, 上海生化);小鼠抗叶酸单克隆抗体(北京翰谱医药生物研究所, 0810001-F1);FITC 标记羊抗小鼠 IgG(英国 Abcam 公司, A22110);叶酸(美国 Sigma 公司);CCK-8 试剂盒(东仁化学科技(上海)有限公司);Hoechst 33342 活细胞染色液(碧云天生物技术研究所);人视网膜母细胞瘤细胞(Y79, 上海斯信生物科技有限公司);北美胎牛血清(德国 Capricorn 公司);RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司)。

1.1.2 实验仪器 旋转蒸发器(上海亚荣);超声波声振仪(美国 Sonics & Materials);低温离心机(德国 Eppendorf 公司);马尔文粒径分析仪(英国 Malvern 仪器有限公司);紫外分光光度计(美国 PerkinElmer 公司);多功能酶标仪(美国博腾仪器有限公司);红外成像仪(美国 ZXF 实验室);超声诊断仪(意大利百胜公司);光声成像仪(加拿大 Visual Sonics 公司);808 nm 激光仪(西安中川光电科技有限公司);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 靶向多功能纳米粒的制备 用双乳化法制备:①将 DPPC、DSPE-PEG2000-Folate 及 Chol 按质量比 5:2:3 共 10 mg 溶解于 2 mL 三氯甲烷中,置旋转蒸发器中 50 $^{\circ}\text{C}$ 减压蒸发,蒸发结束后加入 2 mL PBS 水化备用;②将 100 μL ICG 溶液(10 mg/mL)、100 μL ADM 溶液(10 mg/mL)、200 μL PFP 混匀后,用声震仪乳化 2 min;③将溶液①②混匀乳化 6 min;④将③所得乳液用 PBS 低温离心洗涤,得到靶向多功能纳

米粒 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM。在制备过程中用 DSPE-PEG2000 替代 DSPE-PEG2000-Folate 即得到非靶向多功能纳米粒 ICG/Pct-PFPNP:ADM。制备过程中不添加 ADM 即可得到 ICG/FA/Pct-PFPNP 纳米粒。

1.2.2 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 一般特征检测 取稀释后的纳米粒溶液用马尔文粒径分析仪检测其粒径及电位,光学显微镜及透射电镜观察其形态。

1.2.3 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM ICG 与 ADM 包封率、载药量检测 配制不同浓度的 ICG 和 ADM 标准液,用紫外分光光度计检测其吸光特性,根据 $EE=[(加入药物总质量-上清液中药物质量)/加入药物总质量] \times 100\%$ 和 $LC=[(加入药物总质量-上清液中药物质量)/纳米粒总质量] \times 100\%$, 计算 ICG 和 ADM 的包封率及载药量。

1.2.4 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 体外光热效应检测及光致相变检测 取不同浓度的 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 及 PBS 溶液各 100 μ L 于 96 孔板内,予以 2 W/cm² 的激光辐照,用红外成像仪记录温度变化并采集相应的热图图片。在光学显微镜下采集激光辐照前后纳米粒稀释液的照片。

1.2.5 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 表面叶酸生物活性检测 将 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 及 ICG/Pct-PFPNP:ADM 先后与小鼠抗叶酸单克隆抗体及 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体在室温下共孵育,离心洗涤后用激光共聚焦显微镜及流式细胞仪检测纳米粒表面叶酸表达情况。

1.2.6 细胞培养及 ICG/FA/Pct-PFPNP 细胞毒性检测 Y79 采用含 20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养。将 Y79 接种到 96 孔板中。用培养基将 ICG/FA/Pct-PFPNP 稀释成不同浓度分别加入不同组别继续培养 24 h。用 CCK-8 法检测各组细胞的存活率。

1.2.7 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 体外寻靶能力检测 离心 Y79,用含或不含叶酸的培养基重悬并接种于 6 孔板中,分为 4 组:①阴性对照组;②非靶向组;③靶向组;④抗体封闭组,继续培养 2 h。随后在各组中添加相应的纳米粒后,继续培养。向各孔内加入 Hoechst 33342 活细胞染色液染色并离心洗涤。用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪检测各组纳米粒和 Y79 的结合情况。

1.2.8 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 体外超声/光声双模态显像 将不同浓度纳米粒及 PBS 置于 3% 凝胶模块中,予以 808 nm 激光辐照 (2 W/cm²) 3 min,记录辐照后 B-mode 及 CEUS 图像,并用 DFY 灰度定征软件检测灰度值。将不同浓度纳米粒及 PBS 置于凝胶模块中,于光声成像仪下观察并采集其光声显影图像,并测量其信号强度。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组均数间比较采用单因素方差分析,并用 Levene 检验法判断方差齐性,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒一般特征

使用双乳法,成功制备了 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒。纳米粒悬液呈均匀灰绿色(图 1A),在光学显微镜(图 1B)和透射电镜下观察纳米粒呈球形(图 1C),分散性好未见聚集现象。马尔文粒径分析仪测得 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒大小为 (374.4 ± 23.48) nm(图 1D),平均电位为 (-28 ± 4.5) mV。

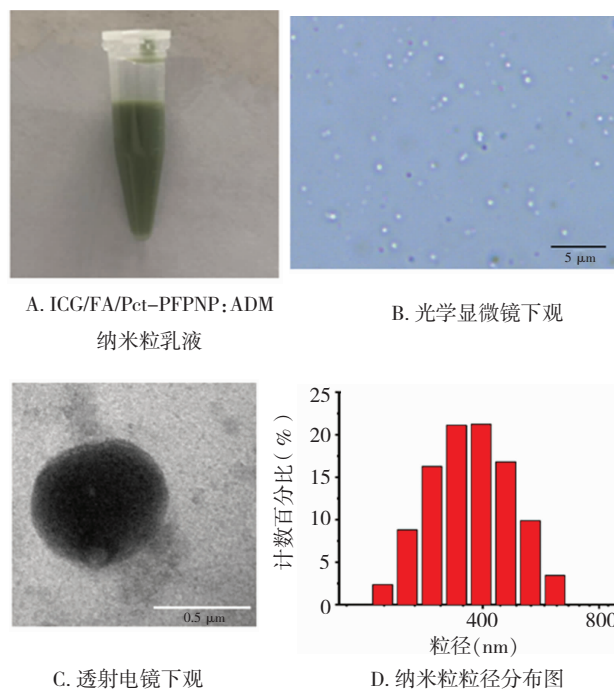


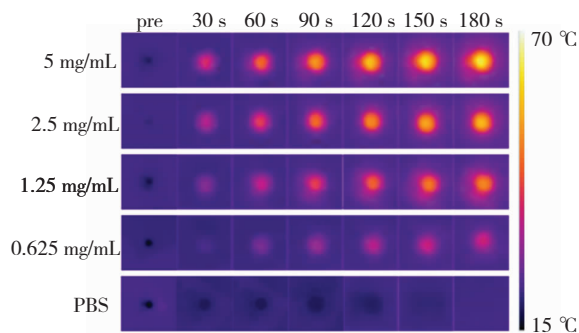
图 1 靶向多功能纳米粒基本性质

2.2 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒 ICG 与 ADM 包封率和载药量

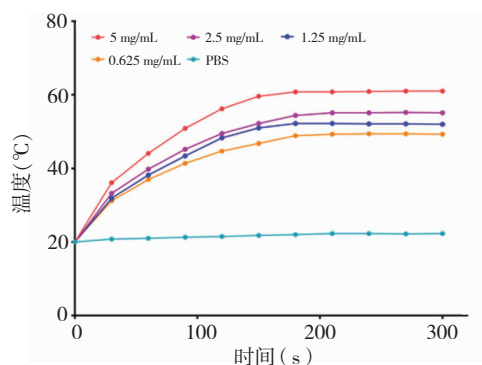
紫外分光光度计测得 ICG 在 780 nm 处的标准曲线,回归方程为 $y=0.0238x+0.0218$, $R^2=0.999$; ADM 在 480 nm 处的标准曲线,回归方程为 $y=0.1774x-0.0742$, $R^2=0.999$ 。根据上清液中 ICG 和 ADM 的吸光值及稀释比例,计算得到 ICG 的包封率为 $(91.85 \pm 2.98)\%$,载药量为 $(9.19 \pm 0.29)\%$; ADM 的包封率为 $(62.04 \pm 5.10)\%$,载药量为 $(6.20 \pm 0.51)\%$ 。

2.3 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒体外光热效应检测及光致相变检测

ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒具有良好的光热效应,用 808 nm 激光以 2 W/cm² 的功率辐照不同浓度的纳米粒溶液,如图 2 所示,各浓度的纳米粒温度均逐渐上升,在 180 s 左右达到最高温,且上升的速度和纳米粒浓度相关,5 mg/mL 的纳米粒最高温度可达到 60.8 $^{\circ}$ C,而 PBS 对照组温度未见明显升高。

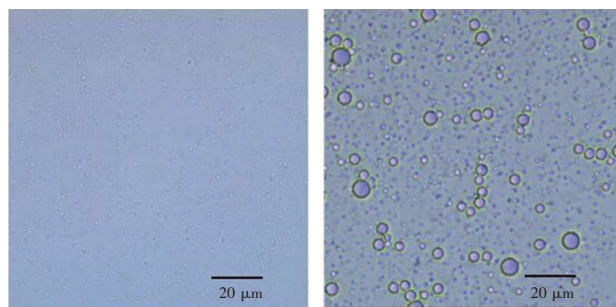


A. 2 W/cm² 激光辐照不同浓度 ICG/FA/Pct-PFPNP: ADM 纳米粒温度随时间变化情况



B. ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒经激光辐照升温曲线图
图 2 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒体外光热效应

ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒在给予激光辐照后能发生液气相变。激光辐照前光学显微镜下观察, 只见分布均匀的纳米粒, 未观察到微泡(图 3A)。纳米粒经过激光辐照开始出现微泡(图 3B), 随着激光辐照时间的延长, 观察到的微泡逐渐增多。

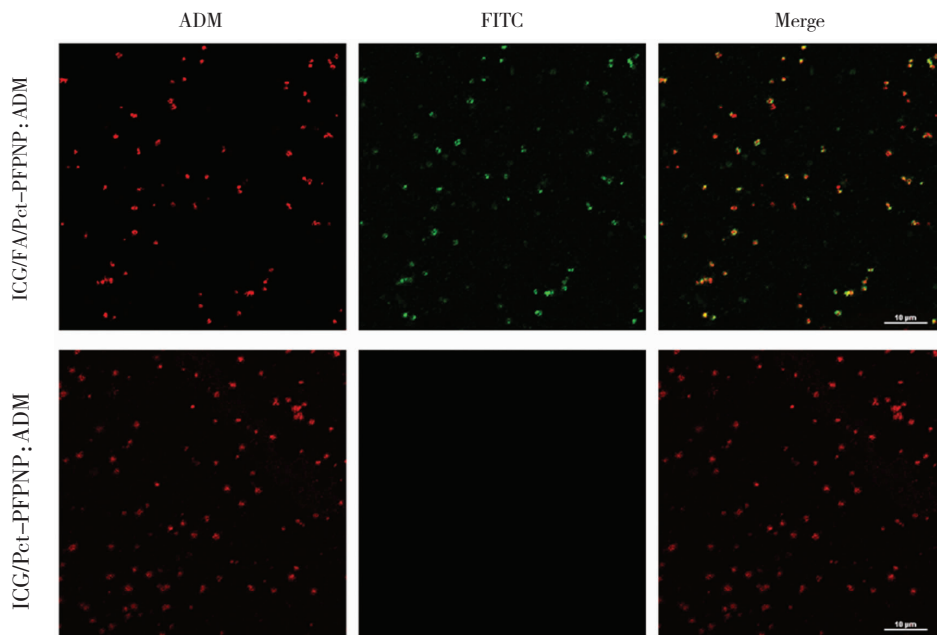


A. 激光辐照前 B. 激光辐照后

图 3 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒激光辐照相变图

2.4 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒表面叶酸生物活性检测

由于 ADM 的特性在相应激光激发下, 激光共聚焦显微镜下观察呈红色荧光。FITC 标记的羊抗小鼠抗体在相应激光激发下, 激光共聚焦显微镜下观察呈绿色荧光。如图 4 所示, 叶酸修饰的 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒和未被叶酸修饰的 ICG/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒由于包载了 ADM, 均呈红色荧光。在与小鼠抗叶酸单克隆抗体和 FITC 标记的羊抗小鼠抗体共孵育后, ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒在激光激发后显绿色荧光, 未被叶酸修饰的 ICG/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒未见绿色荧光。在融合图像上可以看到经过叶酸修饰的 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒呈黄色, 未经过叶酸修饰的 ICG/Pct-PFPNP:ADM 呈红色。由此可见, ICG/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒在经过一系列处理后纳米粒表面依旧有叶酸表达。流式细胞仪检测纳米粒与抗体的连接率为 $(98.83 \pm 0.17)\%$ 。



注: 红色荧光为装载 ADM 的纳米粒, 绿色为 FITC 标记的羊抗小鼠抗体, Merge 为融合通道

图 4 激光检测纳米粒表面叶酸活性

2.5 ICG/FA/Pct-PFPNP 纳米粒细胞毒性检测

如图 5 所示, Y79 细胞的生存率分别为 $(93.69 \pm 3.34)\%$ 、 $(92.42 \pm 3.34)\%$ 、 $(89.92 \pm 4.95)\%$ 、 $(88.71 \pm 4.14)\%$ 、 $(86.81 \pm 4.61)\%$, 各组生存率均在 80% 以上, 各组间差异无统计学意义 ($F=4.304, P>0.05$), 证明 ICG/FA/Pct-PFPNP 纳米粒具有良好的生物安全性。

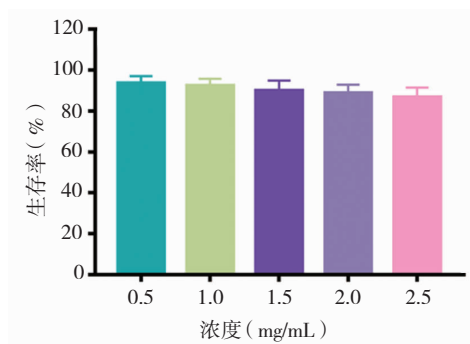


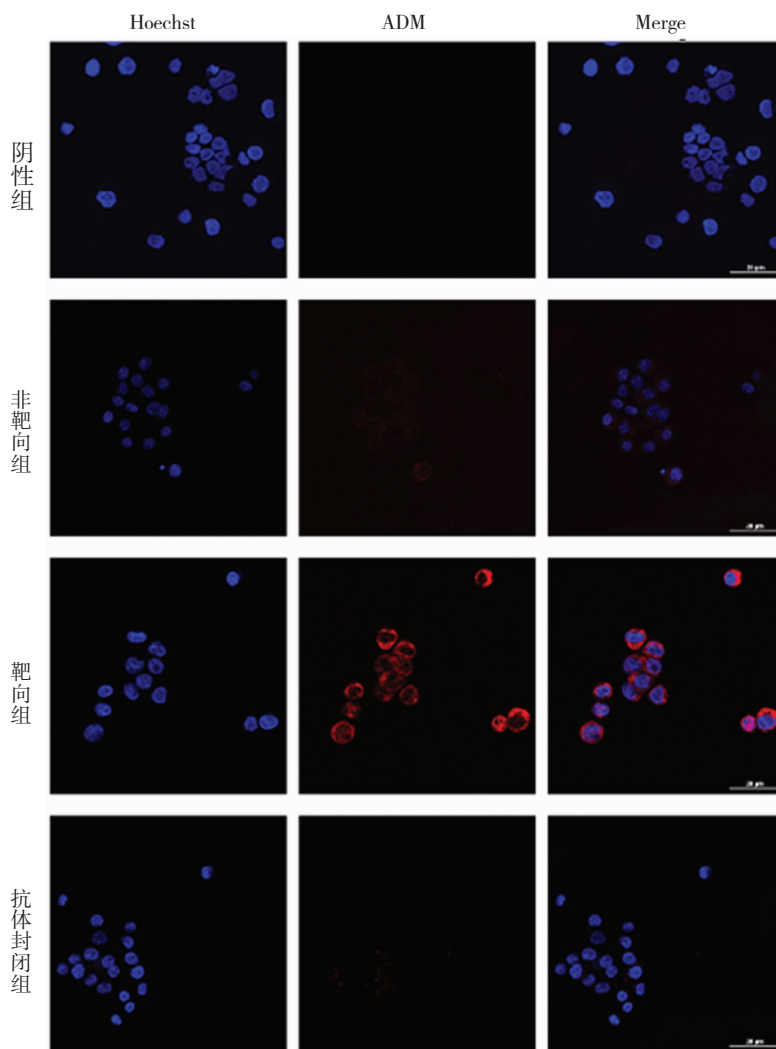
图 5 ICG/FA/Pct-PFPNP 纳米粒细胞毒性检测

2.6 ICG/FA/Pct-PFPNP;ADM 纳米粒体外寻靶能力检测

由于纳米粒加载 ADM, 在激光共聚焦显微镜下呈红色荧光。细胞核用 Hoechst 33342 活细胞染色液标记, 在激光共聚焦显微镜下呈蓝色荧光。如图 6 所示, 靶向组细胞核周围出现大量红色荧光, 相比之下, 非靶向组和抗体封闭组细胞核周围仅出现少量红色荧光。流式细胞仪检测显示靶向组、非靶向组及抗体封闭组与 Y79 细胞连接率分别为 $(96.57 \pm 3.17)\%$ 、 $(12.3 \pm 1.28)\%$ 、 $(11.39 \pm 1.53)\%$, 各组间差异有统计学意义 ($F=1537.600, P=0.000$)。非靶向组 ($P<0.05$)、抗体封闭组 ($P<0.05$) 与靶向组比较差异有统计学意义; 非靶向组和抗体封闭组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.7 ICG/FA/Pct-PFPNP;ADM 纳米粒体外超声/光声双模式显像

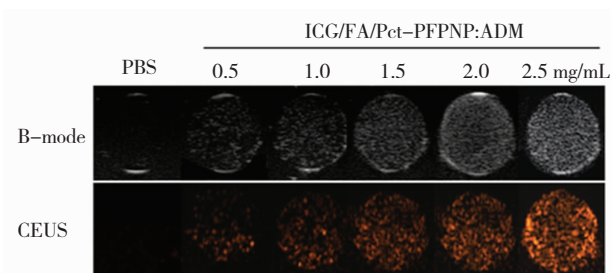
对不同浓度的 ICG/FA/Pct-PFPNP;ADM 纳米粒进行激光 (2 W/cm^2) 辐照 3 min, 超声诊断仪 B-mode 模式和 Contrast 模式下观察到各组超声信号均有增强 (图 7A), 说明激光辐照致纳米粒液气相变能够增强超声显像。用 DFY 软件检测



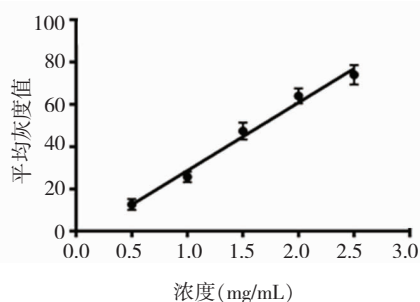
注: 蓝色荧光为 Hoechst 染色标记的 Y79 细胞核, 红色荧光为装载 ADM 的纳米粒, Merge 为融合通道

图 6 激光共聚焦显微镜观察纳米粒与 Y79 细胞结合情况

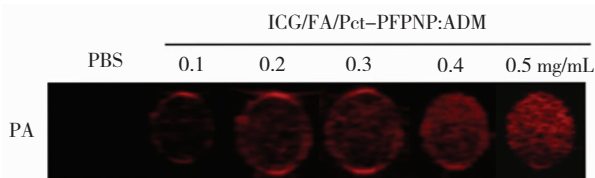
信号平均灰度值,测得各组 CEUS 模式下的灰度值分别为: 12.67 ± 2.52 、 25.67 ± 2.52 、 47.33 ± 4.04 、 64.00 ± 3.61 、 74.00 ± 4.58 ,可以看出纳米粒浓度越高,增强超声信号越强,两者间呈正相关关系(图 7B),且相关程度较高($r=0.994$, $P<0.01$)。对 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒行全波长光声扫描,显示在波长为 706 nm 处有最强光声信号。ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒具有良好的光声显像能力(图 7C),即便是较低浓度的纳米粒仍具有较好的光声显像能力,随着纳米粒浓度上升,光声信号逐渐增强,测量各组光声信号强度分别为: 0.46 ± 0.06 、 0.62 ± 0.04 、 0.86 ± 0.05 、 1.02 ± 0.11 、 1.32 ± 0.05 ,定量分析发现光声信号强度和纳米粒浓度间呈正相关关系(图 7D),且相关程度较高($r=0.979$, $P<0.01$)。



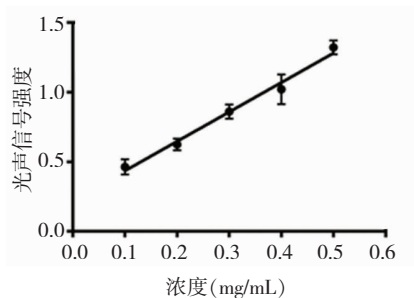
A. 不同浓度 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒体外超声显像



B. 不同浓度与对应超声信号强度定量分析图



C. 不同浓度 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒体外光声显像



D. 不同浓度与对应光声信号强度定量分析图

图 7 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒体外超声/光声双模态显像

3 讨论

RB 是婴幼儿最常见的眼内恶性肿瘤,其恶性程度高,能否早期诊断直接影响患儿预后。目前,临床对 RB 的常用影像学检查手段包括超声、计算机断层扫描和磁共振成像^[16-19]。这些影像学技术较传统的 X 线扫描而言,能较为全面地了解肿瘤的生长情况、周边组织的受累情况但依旧不能做到早期特异性诊断 RB。近年来,超声分子显像技术发展迅速,利用纳米技术构建的造影剂往往具有不同特性,使其能够在到达特定部位的同时实现多模态显像,增加微小病灶的检出率进而实现肿瘤的早期诊断^[20-21]。

本实验所制备的 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒,在光学显微镜、透射电镜、共聚焦显微镜下呈球形,大小均一,分散性好。测得其粒径为 (374.4 ± 23.48) nm。有研究表明^[22]肿瘤微血管孔径为 100~780 nm,本研究所制备的纳米粒成功解决了微米级的微泡造影剂不能穿过血管内皮细胞间隙靶向肿瘤细胞的难题^[23-25]。基于其粒径的优势,纳米粒通过高渗透滞留(enhanced permeability and retention, EPR)效应储积于肿瘤组织。与此同时,ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒表面的叶酸表达率高达 $(98.83 \pm 0.17)\%$,这就使得纳米粒更容易与叶酸受体高表达的视网膜母细胞瘤 Y79 细胞相结合,通过受体介导的细胞内吞作用进入细胞发挥作用^[26-27]。在体外寻靶实验中,靶向组纳米粒较多聚集于 Y79 细胞核周围,而非靶向组和抗体封闭组纳米粒只有少量聚集于 Y79 细胞核周围。流式细胞术结果也提示靶向组纳米粒与细胞结合率明显高于其他 2 组。上述结果均说明所制备的 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒对 Y79 细胞具有良好的靶向作用。

本研究所制备的纳米粒同时装载 ICG 和 PFP,实现了超声/光声双模态显像。在本实验中,ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM 纳米粒 ICG 的包封率高达 $(91.85 \pm 2.98)\%$,载药量为 $(9.19 \pm 0.29)\%$ 。在体外光声成像实验中可以发现,在激光激发下,随着纳米粒浓度的增加,光声信号强度逐渐增强,而 PBS 对照组未见明显变化。

另外,ICG 吸收光能转变为热能,局部温度最高可达到 60.8 °C 由于周围环境温度的改变,纳米粒核心的 PFP 发生液气相变从而带动纳米粒的膨胀变大,这极大的增强了超声 B-mode 及 CEUS 的信号,

以实现更精准的超声诊断。有研究^[28]发现载液态氟碳的 PLGA 纳米粒不仅可以实现乳腺癌的超声成像,还具有一定的治疗作用。这是由于液态氟碳相变时产生的爆破作用可以对肿瘤细胞造成机械性损伤,从而达到治疗肿瘤的效果。因此本研究所制备的纳米粒不仅能实现超声/光声双模态显像用于 RB 的早期诊断,也为 RB 的治疗方面奠定了基础。

综上所述,本实验成功制备了以叶酸受体为靶点,以 PFP 为核心,同时装载 ICG 及 ADM 的靶向多功能纳米粒 ICG/FA/Pct-PFPNP:ADM。其具备良好的光热效应、双模态显像能力,并能通过纳米粒表面高表达的叶酸主动靶向 RB 细胞,为下一步体外治疗及体内探索实现 RB 的超声及光声双模态分子显像与靶向治疗奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Pandey AN. Retinoblastoma; an overview[J]. Saudi J Ophthalmol, 2014, 28(4): 310–315.
- [2] Kivelä T. The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer; retinoblastoma, an issue of birth and death[J]. Br J Ophthalmol, 2009, 93(9): 1129–1131.
- [3] Abramson DH. Retinoblastoma in the 20th century: past success and future challenges the Weisenfeld lecture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(8): 2683–2691.
- [4] Canturk S, Qaddoumi I, Khetan V, et al. Survival of retinoblastoma in less-developed countries impact of socioeconomic and health-related indicators[J]. Br J Ophthalmol, 2010, 94(11): 1432–1436.
- [5] Broadus E, Topham A, Singh AD. Survival with retinoblastoma in the USA: 1975–2004[J]. Br J Ophthalmol, 2008, 93(1): 24–27.
- [6] Maccarthy A, Birch JM, Draper GJ, et al. Retinoblastoma: treatment and survival in Great Britain 1963 to 2002[J]. Br J Ophthalmol, 2009, 93(1): 38–39.
- [7] Jain AK, Das M, Swarnakar NK, et al. Engineered PLGA nanoparticles: an emerging delivery tool in cancer therapeutics[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2011, 28(1): 1–45.
- [8] 易衡静, 张亮, 王志刚, 等. 靶向肿瘤细胞的相变型纳米粒多模态显像及其声动力治疗的体外实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(10): 822–827.
- [9] De la A, Liu Z, Bodapati S, et al. Ultrahigh sensitivity carbon nanotube agents for photoacoustic molecular imaging in living mice[J]. Nano Letters, 2010, 10(6): 2168–2172.
- [10] Sano K, Ohashi M, Kanazaki K, et al. Indocyanine green-labeled polysarcosine for in vivo photoacoustic tumor imaging[J]. Bioconjug Chem, 2017, 28(4): 1024–1030.
- [11] Rapoport N. Drug-loaded perfluorocarbon nanodroplets for ultrasound-mediated drug delivery[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 880: 221–241.
- [12] 王志刚. 多功能超声分子探针显像与增效高强度聚焦超声治疗[J]. 临床超声医学杂志, 2017, 30(9): 7–9.
- [13] Kansara V, Paturi D, Luo S, et al. Folic acid transport via high affinity carrier-mediated system in human retinoblastoma cells[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 355(1): 210–219.
- [14] Jwala J, Vadlapatla RK, Vadlapudi AD, et al. Differential expression of folate receptor- α , sodium-dependent multivitamin transporter, and amino acid transporter (B(0,+)) in human retinoblastoma (Y-79) and retinal pigment epithelial (ARPE-19) cell lines[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2012, 28(3): 237–244.
- [15] Chen Q, Wen J, Li H, et al. Recent advances in different modal imaging-guided photothermal therapy[J]. Biomaterials, 2016, 106: 144–166.
- [16] 陆 烨, 童剑萍. 视网膜母细胞瘤的发生机制及诊断和治疗进展[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(6): 1007–1014.
- [17] 张 蕾, 宋国祥. PET/CT 在眼部肿瘤诊断中的应用[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(4): 380–384.
- [18] Vasquez LM, Giulieri GP, Halliday W, et al. Ultrasound biomicroscopy in the management of retinoblastoma[J]. Eye, 2011, 25(2): 141–147.
- [19] Sirin S, Schlamann M, Metz KA, et al. High-resolution MRI using orbit surface coils for the evaluation of metastatic risk factors in 143 children with retinoblastoma: Part 1: MRI vs. histopathology[J]. Neuroradiology, 2015, 57(8): 1–10.
- [20] 汪 超, 范 亲, 顾 臻, 等. 纳米技术在癌症预防、诊断和治疗中的应用研究进展[J]. 科技导报, 2018, 36(22): 96–107.
- [21] Lammers T, Aime S, Hennink WE, et al. Theranostic Nanomedicine[J]. Accounts of Chemical Research, 2011, 44(10): 1029–1038.
- [22] 李 洁, 余振南, 邓意辉. 高渗透长滞留效应理论在肿瘤靶向药物传递系统设计中的应用进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(2): 150–159.
- [23] 王志刚, 冉海涛. 超声分子影像学[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 4–5.
- [24] Gullotti E, Yeo Y. Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery[J]. Molecular Pharmaceutics, 2009, 6(4): 1041–1051.
- [25] Nichols JW, Bae YH. EPR: Evidence and fallacy[J]. Journal of Controlled Release, 2014, 190: 451–464.
- [26] Yang J, Vlashi E, Low P. Folate-linked drugs for the treatment of cancer and inflammatory diseases[J]. Sub-cellular Biochemistry, 2012, 56: 163–179.
- [27] Zheng C, Zheng M, Gong P, et al. Indocyanine green-loaded biodegradable tumor targeting nanoprobe for in vitro and in vivo imaging[J]. Biomaterials, 2012, 33(22): 5603–5609.
- [28] Liu F, Chen Y, Li Y, et al. Folate-receptor-targeted laser-activatable poly(lactide-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with paclitaxel/indocyanine green for photoacoustic/ultrasound imaging and chemo/photothermal therapy[J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 5139–5158.

(责任编辑: 唐秋姗)