DOI:10.12441/spyswjs.20230319003 [文章编号] 1673-1689(2025)06-0050-09

糖原负载光敏剂用于肿瘤光动力治疗的研究

马可可[1,2] 方久锐[1] 张慧杰[1] 陈敬华[1*]

(1. 江南大学生命科学与健康工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】合成用于负载光敏剂TTVBA的氨基化糖原(NG)载体,构建肿瘤光动力治疗(PDT)纳米药物递送系统(NGT NPs)。**【方法】**通过二乙烯三胺(DETA)修饰糖原,合成带正电荷的NG,并基于静电作用负载光敏剂TTVBA制备NGT NPs。运用红外光谱、动态光散射(DLS)、透射电镜(TEM)等对纳米粒子进行结构表征,通过溶血试验评估生物相容性,利用DCFH-DA探针检测活性氧(ROS)生成能力,并采用CCK-8法和AM/PI染色评价其体外抗肿瘤活性。**【结果】**NGT NPs呈规则球形,粒径为104.8 nm,表面电位为23.83 mV。光照条件下,20 μg/mL NGT NPs产生的ROS水平是黑暗条件下的12倍,且溶血率低于0.41%,表明其具有良好的生物相容性。在B16细胞试验中,光照处理的NGT NPs组ROS水平极其显著升高(P<0.001);随着NGT NPs质量浓度的升高,细胞存活率逐渐下降;AM/PI染色结果显示,光照组细胞死亡数量明显多于对照组。**【结论】**NGT NPs具有良好的生物相容性、光响应ROS生成能力及抗肿瘤活性,为肿瘤PDT提供了一种新型高效的纳米载体策略。

关键词:药物递送;糖原;光敏剂;光动力治疗

Photosensitizer-loaded Glycogen for Photodynamic Therapy of Tumor

MA Keke[1,2] *FANG Jiurui*[1] *ZHANG Huijie*[1] *CHEN Jinghua*[1*]

(1. School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of this study is to synthesize aminated glycogen (NG) for loading of the photosensitizer TTVBA and construct a nano drug delivery system (NGT NPs) for photodynamic therapy (PDT) of tumors. [**Method**] Positively charged NG was synthesized through modification of glycogen with diethylenetriamine (DETA). Then, TTVBA was encapsulated by NG *via* electrostatic interaction to prepare NGT NPs. The prepared NGT NPs were characterized by infrared spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), and transmission electron microscopy (TEM). The hemolysis assay was performed to evaluate the biocompatibility of NGT NPs. The reactive oxygen species (ROS) generation capability of cells treated with NGT NPs was detected with the DCFH-DA probe. The *in vitro* antitumor activity of NGT NPs was assessed by the CCK-8 assay and AM/PI staining. [**Result**] NGT NPs were spherical, with the diameter of 104.8 nm and the surface potential of 23.83 mV. The ROS generated by the cells treated with NGT NPs (20 μg/mL) under light was 12 folds of that in the dark. The NGT NPs group possessed a hemolysis rate below 0.41%, which indicated excellent biocompatibility. In B16 cells under light, NGT NPs raised the ROS level (P<0.001) while reducing the cell survival rate in a mass concentration-dependent manner. AM/PI staining showed more cell death in the light group than in the control group. [**Conclusion**] NGT NPs possessed good biocompatibility, light-responsive induction of ROS generation, and antitumor activity. This work provides a novel and efficient nanocarrier for the PDT of tumors.

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(21907041);国家"十四五"重点研发计划项目(2021YFC2103100)。

通信作者:陈敬华(1971—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事药剂学及生物医用高分子材料研究。 E-mail:chenjinghua@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-03-19 **修回日期:**2023-04-20

Keywords: drug delivery; glycogen; photosensitizer; photodynamic therapy

癌症作为威胁人类生命健康最严重的疾病，至今多数类型尚无有效的治疗方法[1]。传统的癌症治疗方法，如放疗和化疗，虽然能杀死大部分肿瘤细胞，但无法有效区分肿瘤细胞与正常细胞，因此会产生严重的毒副作用。为减轻这些毒副作用，越来越多的新型治疗方法逐渐涌现[2]。PDT是其中极具潜力的新型治疗手段，与传统治疗方法不同，PDT是在肿瘤部位注射光敏剂。光敏剂本身在体内较为稳定，不会与其他生物分子发生反应，但在局部光照下，光敏剂能够通过电子转移能量，在肿瘤细胞中产生足量的ROS，具有细胞毒性的ROS会引发一系列生化反应，促使肿瘤细胞裂解死亡[3-6]。由于PDT具有高选择性、微创性等优点，受到了广泛关注。然而，大多数光敏剂存在肿瘤特异性差、水溶性差且容易聚集等缺点，导致其疗效降低，严重制约了PDT的临床应用。因此，研发安全高效的光敏剂载体是PDT发挥疗效的关键[7-9]。

糖原是由葡萄糖聚合而成的大分子聚合物，具备良好的生物相容性和降解性，其天然的球形树枝状纳米结构使其成为一种理想的药物递送载体[10-13]。此外，糖原易通过化学修饰引入其他官能团[10-17]。通过对糖原进行表面修饰和结构改造，可赋予其特定的靶向性和环境响应性。近年来，基于糖原的药物递送研究备受关注[18]。研究表明，糖原纳米粒子能够有效装载和递送抗癌药物，提高药物在肿瘤部位的富集与释放效率，既能增强抗肿瘤治疗效果，又能减轻药物对正常组织的损伤和毒副作用。然而，利用糖原载体递送光敏剂用于PDT的研究鲜有报道。

作者利用二乙烯三胺对天然糖原进行修饰，成功合成了NG。TTVBA是由硝基苯甲酸与芳香胺缩合得到的含有三苯环和苯并噻唑环的I型光敏剂，在光照条件下可产生ROS。此外，TTVBA作为AIE型光敏剂可用于细胞成像。作者通过静电作用将NG和TTVBA组装成NGT NPs，利用红外光谱、DLS和TEM等对NGT NPs进行结构表征，并分析了NGT NPs的生物相容性、在B16细胞内产生ROS的能力及体外抗肿瘤活性，以期为肿瘤PDT提供一种新型高效的纳米载体策略。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

糖原：上海源叶生物科技有限公司；羰基二咪唑（CDI）、DETA：安耐吉化学技术有限公司；5-醛基-2-噻吩硼酸、2-甲基-5-硝基苯甲酸甲酯：上海毕得医药科技有限公司；RPMI 1640培养基：美国Gibco公司；新生牛血清：杭州四季青生物工程有限公司；CCK-8试剂盒、胰蛋白酶：上海碧云天生物技术有限公司；小鼠B16细胞：中国科学院细胞库；其他化学试剂：国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

低温高速离心机：5430R型，德国Eppendorf公司；氙灯：北京泊菲莱科技有限公司；DLS：Zetasizer Nano ZS型，英国Malvern公司产品；全数字化核磁共振波谱仪：Aduance III型，德国Bruker公司；红外光谱仪：TENSOR II型，德国Bruker公司；光学显微镜：E200型，日本尼康公司；TEM：JEM-2100HR型，日本JEOL公司；荧光分光光度计：Eclipse 960型，日本Shimadzu公司；CO_2恒温培养箱：3111型，美国Thermo Fisher Scientific公司；流式细胞分析仪：CytoFLEX型，美国Beckman Coulter公司；酶标仪：iMark型，美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 载体NG的制备

NG合成示意图见图1。取400 mg糖原和600 mg CDI溶解在无水DMSO中，糖原的羟基在氮气保护下被CDI活化3 h，然后使用1 mL注射器缓慢滴加1 mL二乙烯三胺，连续反应24 h。反应液用透析袋（截留相对分子质量14 000）在超纯水中透析3 d，然后放入真空冷冻干燥机中冷冻干燥。冻干后得到白色固体产物NG。

1.3.2 光敏剂TTVBA合成方法

光敏剂TTVBA合成示意图见图2，将5-（4-（二苯基氨基）苯基）-噻吩-2-甲醛（0.3 mmol/L）、2-甲基-5-硝基苯甲酸甲酯（0.3 mmol/L）和K_2CO_3（0.9 mmol/L）加入80 ℃的DMSO溶液中搅拌24 h。次

日，将反应液冷却至室温，向其中加入 100 mL 饱和氯化钠溶液，过滤得到红色沉淀 TTVBA。滤液用乙酸乙酯萃取，收集合并萃取物，依次用去离子水和氯化钠溶液洗涤以除去杂质，加入适量 Na_2SO_4 干燥后过滤，除去乙酸乙酯得到另一部分 TTVBA。

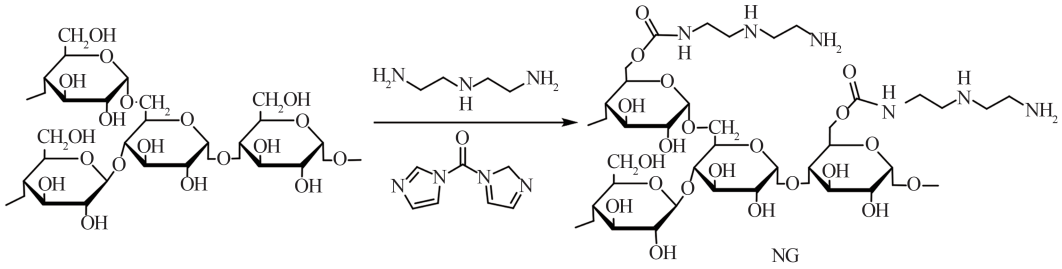


图 1　NG 合成示意图

Fig. 1　Synthetic diagram of NG

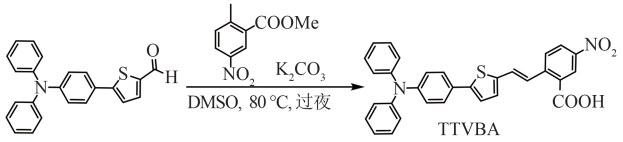


图 2　光敏剂 TTVBA 合成示意图

Fig. 2　Synthetic diagram of photosensitizer TTVBA

1.3.3　NGT NPs 的制备

取 10 mg NG 溶于 1 mL 超纯水中，制备成 10 mg/mL 的母液 A。取 10 mg 光敏剂 TTVBA 溶于 100 μL 无水 DMSO 中，制备成 100 mg/mL 的母液 B。在振荡条件下将母液 B 缓慢滴加到母液 A 中（母液 A 与母液 B 体积比 1 000∶1），滴加结束后继续振荡 2 h 制得 NGT NPs。

1.3.4　载体 NG 的红外表征

取适量的糖原和 NG，分别与溴化钾混合研磨压片后，放入红外光谱仪中。设置扫描波数为 4 000~500 cm^{-1}，记录透光率随波数变化的曲线，得到样品的红外光谱图。

1.3.5　光敏剂 TTVBA 的结构表征

称取 10 mg 的 TTVBA 溶解于氘代 DMSO 中，利用核磁共振波谱仪获取光敏剂 TTVBA 的 ^{1}H-NMR，以确定目标产物。

1.3.6　NGT NPs 的结构表征

取相同质量的光敏剂 TTVBA 和 NGT NPs 分别溶于 4 mL DMSO 中，制成均匀、透明、无杂质的样品溶液。将样品放入荧光分光光度计的样品池中，检测其在激发波长 400 nm 时的相对荧光发射强度。分别制备 1 mg/mL 的 NG 和 NGT NPs 水溶液，超声 5 min 至样品完全溶解，然后过 0.22 μm 的水系滤膜除去气泡和其他杂质。利用 DLS 测定 NG 和 NGT NPs 的平均粒径、粒径分布和表面电位。分别配制 0.5 mg/mL 的 NG 和 NGT NPs 水溶液，取 10 μL 水溶液缓慢滴加在铜网上，形成半球形水滴状，自然干燥后，利用 TEM 观察拍照。

1.3.7　NGT NPs 在光照下产生 ROS 的能力

称取适量的 NG 制备成 1 mg/mL 的母液，然后用超纯水将 NG 和 NGT NPs 分别稀释至 0、2.5、5.0、10.0、20.0 μg/mL 备用。ROS 可以氧化无荧光的探针 DCFH 生成 DCF，DCF 在 522 nm 处可发射出绿色荧光。将不同质量浓度的 NG 和 NGT NPs 分别加入 DCFH-DA 孵育 20 min。黑暗组中，NG 和 NGT NPs 2 组样品全程避光；光照组中，试验前 30 min 打开氙灯光源预热，使光能量密度稳定在 100 mW/cm^2，将孵育完成的 NG 和 NGT NPs 2 组样品放入氙灯光源下照射 5 min，随后检测 2 组样品在 522 nm 处的相对荧光强度，样品的相对荧光强度代表了其产生 ROS 的能力。

1.3.8　NGT NPs 的生物相容性

配制 10 mg/mL 的 NGT NPs 母液，将母液用 PBS（pH 7.4）稀释为 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μg/mL 的溶液待用。将小鼠血液置于抗凝管中，于 3 000 r/min 离心 10 min，分离出血液中的红细胞。用 PBS 吹吸洗涤红细胞至上清液澄清。取 1.5 mL 离心管，每管加 200 μL 红细胞，再分别加入 800 μL 不同质量浓度的 NGT NPs 溶液。另取 2 管分别加入 PBS 和超纯水，分别作为阴性对照（0% 溶血）和阳性对照（100% 溶血）。将所有样品组及

对照组置于37 ℃水浴锅中孵育4 h，离心取上清液，检测各组在540 nm处的吸光度。溶血率根据式(1)计算。

$$R_h=\frac{A-A_0}{A_{100}-A_0}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

R_h——溶血率，%；

A——样品组上清液的吸光度；

A_0——阴性对照组上清液的吸光度；

A_{100}——阳性对照组上清液的吸光度。

1.3.9　NGT NPs刺激B16细胞产生ROS的能力

收集对数生长期的B16细胞，用培养基将细胞悬液稀释至1×10^5个/mL，每个共聚焦皿或六孔板中加入1 mL细胞悬液。次日，弃去旧培养基，加入1 mL含NGT NPs(50 μg/mL)的培养基培养8 h，弃去旧培养基，用PBS清洗2~3次，加入1 mL的DCFH-DA探针孵育20 min，然后用PBS清洗除去未装载的荧光探针。光照组置于氙灯光源下进行全波长光照处理(5 min，100 mW/cm^2)。光照结束后，利用流式细胞仪定量检测B16细胞中的绿色荧光，并利用激光共聚焦显微镜定性检测B16细胞中的绿色荧光[19]。

1.3.10　NGT NPs光动力抗肿瘤活性测定

将B16细胞悬液稀释至5×10^4个/mL，接种于96孔板中，每孔加100 μL细胞悬液，在37 ℃恒温培养箱中培养过夜。配制10 mg/mL的NGT NPs母液备用，用新鲜培养基分别稀释至200.0、100.0、50.0、25.0、12.5 μg/mL。取出贴壁的B16细胞，弃去旧培养基，依次加入100 μL含不同质量浓度药物的培养基培养4 h。置于氙灯光源下进行全波长照射(5 min，100 mW/cm^2)。照射后继续在培养箱中培养20 h，随后每孔加入10 μL CCK-8溶液孵育30 min，于450 nm波长下检测样品的吸光度。细胞存活率根据式(2)计算。

$$V_C=\frac{A_1-A_2}{A_3-A_4}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

V_C——细胞存活率，%；

A_1——含细胞、药物和CCK-8溶液的吸光度；

A_2——含药物和CCK-8溶液的吸光度；

A_3——含细胞、纯培养基和CCK-8溶液的吸光度；

A_4——含纯培养基和CCK-8溶液的吸光度。

1.3.11　AM/PI染色

用1 mL胰酶消化B16细胞，加血清终止消化，离心后加1 mL培养基重悬并进行细胞计数。每个共聚焦皿铺3×10^5个细胞，贴壁培养过夜，用PBS洗涤2~3次。加1 mL含药培养基培养4 h后放入氙灯光源下进行全波长照射(5 min，100 mW/cm^2)，继续培养4 h。收集含有死细胞的旧培养基，用PBS洗涤共聚焦皿中下层贴壁的B16活细胞，然后加入AM/PI染色液，孵育20 min，用PBS洗涤2~3次。在收集到的死细胞中加入AM/PI染色液，孵育20 min，重新加到共聚焦培养皿中。使用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)随机选取视野进行拍照。

1.3.12　统计分析

数据以平均值±标准差表示，运用SPSS 23.0软件进行t检验或方差分析。

2　结果与讨论

2.1　NG的合成及红外光谱图

在CDI的活化下，糖原上的羟基与DETA反应形成氨酯结构，同时在糖原表面暴露DETA的另一个伯氨基，实现糖原的氨基官能团修饰。糖原和NG的红外光谱图见图3。与糖原相比，NG在1 693 cm^{-1}处有酰胺键的特征吸收峰，这是由—C═O伸缩振动产生的。此外，NG与糖原在1 531 cm^{-1}和1 253 cm^{-1}处的吸收峰也存在差异，这2个吸收峰分别对应—NH—弯曲振动和C—N伸缩振动。这些特征峰的出现表明已成功制备了NG，且DETA与糖原通过

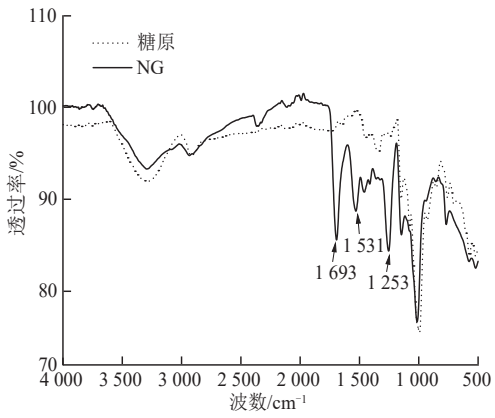


图3　糖原和NG的红外光谱图

Fig. 3　Infrared spectra of glycogen and NG

酰胺键连接。

2.2 光敏剂 TTVBA 的 ^{1}H-NMR 图

根据光敏剂与氧气作用机理的不同将产生的 ROS 分为 2 种类型：I 型 ROS 是光敏剂通过电子转移形成的，主要包括超氧阴离子自由基、过氧化氢和羟基自由基；II 型 ROS 是氧气通过能量转移产生的单线态氧。I 型 ROS 产生过程主要通过电子转移而非能量转移，耗氧较低，因此不依赖氧气浓度，可以在低氧环境下有效杀伤肿瘤细胞，在治疗实体瘤中具有显著优势。此外，I 型光敏剂还可以通过结合载体来实现多模式协同治疗。通过 NMR 测定 TTVBA 的核磁结果为：^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6），δ 8.42（d，J=2.6 Hz，1H）、δ 8.10（dd，J=8.7、2.6 Hz，1H）、δ 7.98（d，J=3.9 Hz，1H）、δ 7.68~7.64（m，1H）、δ 7.57（d，J=8.8 Hz，2H）、δ 7.37（d，J=3.8 Hz，1H）、δ 7.35~7.28（d，J=7.8 Hz，6H）、δ 7.23（d，J=3.8 Hz，1H）、δ 7.11（d，J=7.3 Hz，1H）、δ 7.04~7.01（d，J=7.6 Hz，4H）、δ 6.94（d，J=8.7 Hz，2H），见图 4。核磁结果与 Wang 等[20]的结果一致，表明所合成的化合物为光敏剂 TTVBA。

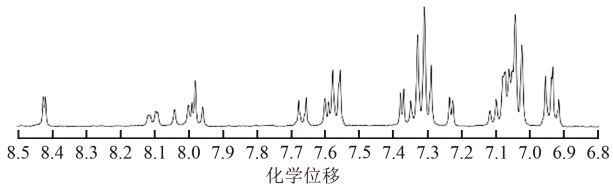


图 4 光敏剂 TTVBA 的 ^{1}H-NMR 图

Fig. 4 ^{1}H-NMR spectrum of TTVBA

2.3 NGT NPs 的制备及结构表征

当光敏剂受到特定波长的光激发后，会发射出具有特定波长的荧光。为验证 NGT NPs 是否像 TTVBA 一样具有特定的荧光发射波长，利用荧光分光光度计检测 TTVBA 和 NGT NPs 的荧光发射光谱，见图 5。NGT NPs 和 TTVBA 的特征峰位、强度及形状均相似，表明两者具有相同的荧光发射特性。同时，这也证明了 TTVBA 已被成功装载至 NG 中，能够发挥光敏剂的作用。

利用马尔文 Zeta 电位仪测定 TTVBA、NG 和 NGT NPs 的电位，见图 6。结果表明，TTVBA、NG 和 NGT NPs 的电位分别为（−27.6±0.57）、（36.73±0.71）、（23.83±0.98）mV。NG 在装载光敏剂后，其电位由（36.73±0.71）mV 降至（23.83±0.98）mV，这是由于 TTVBA 带负电荷，中和了 NG 表面的部分正电荷。肿瘤细胞膜表面带有负电荷，具有较强正电荷的 NGT NPs 可提高肿瘤细胞对纳米粒子的摄取效率。

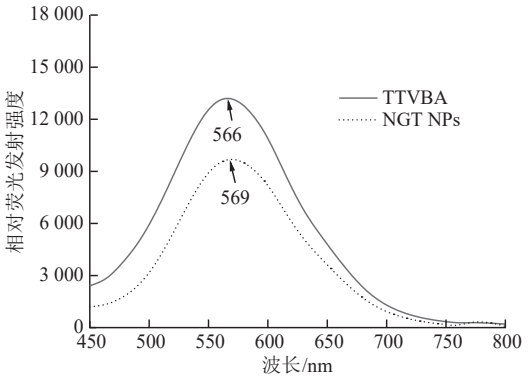


图 5 TTVBA 和 NGT NPs 的荧光发射光谱图

Fig. 5 Photoluminescence spectra of TTVBA and NGT NPs

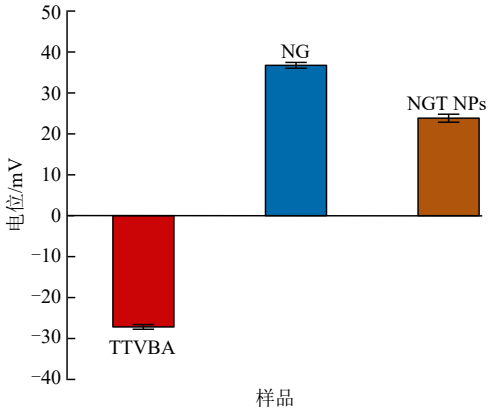
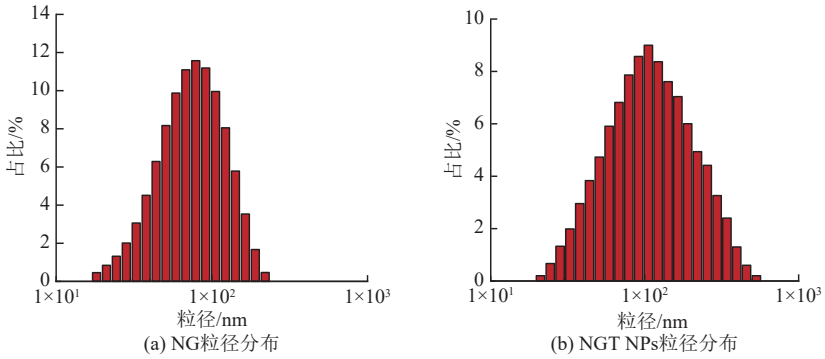


图 6 TTVBA、NG 和 NGT NPs 的 Zeta 电位

Fig. 6 Zeta potential of TTVBA, NG, and NGT NPs

粒径是影响纳米粒子药物递送的关键因素之一。在肿瘤治疗中，利用增强渗透和保留效应（EPR）实现靶向递送的理想粒径为 30~200 nm。当粒径低于 30 nm 时，药物半衰期短，易被肾脏过滤清除；当粒径大于 200 nm 时，容易聚集在脾脏和肝脏中。利用 DLS 测定了 NG 装载 TTVBA 前后的平均粒径及分布，见图 7。NG 的平均粒径为 65.8 nm，NGT NPs 的平均粒径为 104.8 nm，且 80% 的 NGT NPs 粒径分布在 30~200 nm。因此，NGT NPs 有望延长其在血液中的循环时间，并通过 EPR 富集到肿瘤部位，从而更好地发挥抗肿瘤作用。

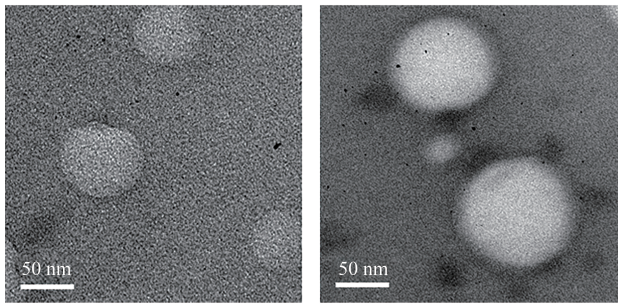


(a) NG粒径分布　(b) NGT NPs粒径分布

图 7　NG 和 NGT NPs 的粒径分布

Fig. 7　Particle diameter distribution of NG and NGT NPs

纳米粒子的微观结构见图 8。NG 和 NGT NPs 均呈规则球形，分散性较好，粒子大小与 DLS 测得结果一致。



(a) NG的微观结构　(b) NGT NPs的微观结构

图 8　NG 和 NGT NPs 的微观结构

Fig. 8　Microstructure of NG and NGT NPs

2.4　NG 和 NGT NPs 产生 ROS 的能力

使用荧光分光光度计检测不同样品在 522 nm 处的相对荧光强度，通过相对荧光强度来评价样品产生 ROS 的能力。不同质量浓度的 NG 和 NGT NPs 产生 ROS 的相对荧光强度见图 9。不同质量浓度的 NG 在黑暗和光照条件下产生 ROS 的水平无明显差异；相同质量浓度的 NGT NPs 在光照条件下产生 ROS 的水平明显高于黑暗条件，且随着 NGT NPs 质量浓度的升高，产生 ROS 的水平呈逐渐升高的趋势。20 μg/mL 的 NGT NPs 在光照条件下产生 ROS 的水平是黑暗条件下的 12 倍，是 0 μg/mL 组的 33 倍。结果表明，NGT NPs 不仅具有光响应选择性（仅在光照条件下发挥作用），还具备高效的光吸收能力，可在较低质量浓度下产生足量的 ROS。

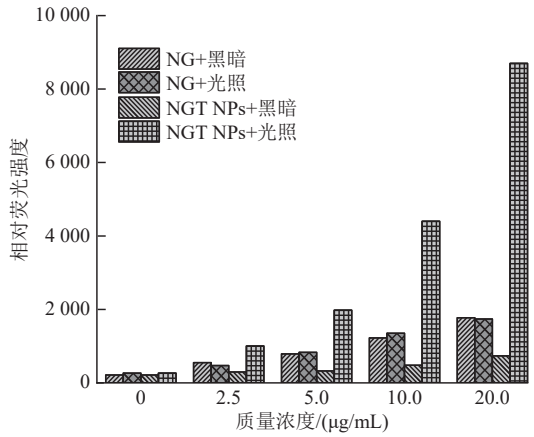


图 9　NG 和 NGT NPs 处理的细胞产生 ROS 的相对荧光强度

Fig. 9　Relative fluorescence intensity of ROS generated by cells treated with NG and NGT NPs

2.5　NGT NPs 的生物相容性结果

通过溶血试验评价 NGT NPs 的血液生物相容性。将不同质量浓度的 NGT NPs 与红细胞在 37 ℃下共同孵育 4 h，通过观察红细胞的裂解情况评估 NGT NPs 的生物相容性。不同质量浓度 NGT NPs 的溶血率见图 10。NGT NPs 质量浓度为 200.0 μg/mL 时，溶血率仅为阳性对照组的 0.41%，显著低于阳性对照组。从图 11 可以看出，即使 NGT NPs 的质量浓度为 200.0 μg/mL，离心管中的红细胞仍未出现溶血现象，表明 NGT NPs 具有良好的生物相容性。

2.6　NGT NPs 在 B16 细胞内产生 ROS 的能力

ROS 可激活肿瘤抑制基因，诱导肿瘤细胞凋亡，因此 NGT NPs 在细胞中产生 ROS 的水平是评价其光动力效应强弱的重要指标之一。作者选用 DCFH-DA 荧光探针作为 ROS 的指示剂，利用流

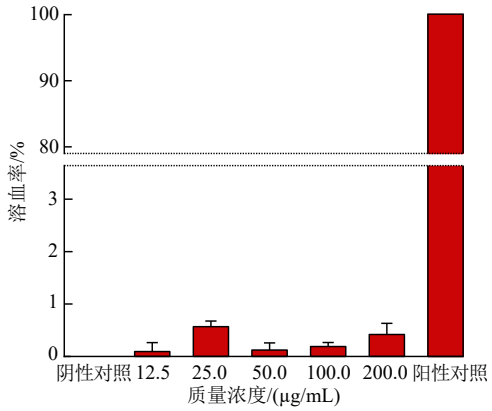


图 10　不同质量浓度 NGT NPs 处理的细胞的溶血率

Fig. 10　Hemolysis rates of cells treated with NGT NPs at different mass concentrations

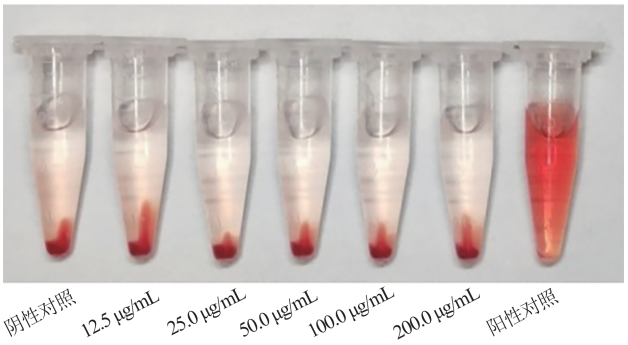
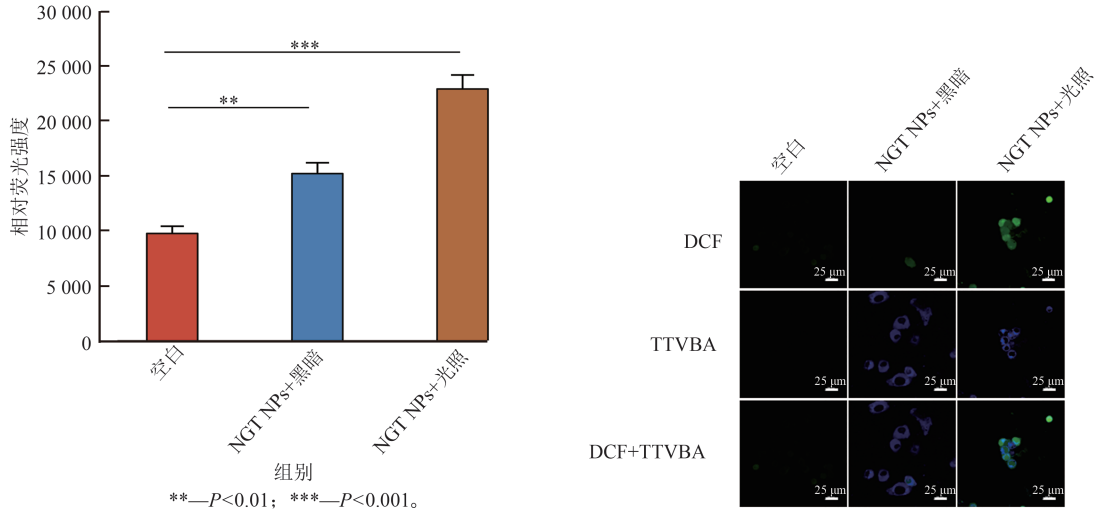


图 11　不同质量浓度 NGT NPs 的溶血图

Fig. 11　Hemolysis of NGT NPs at different mass concentrations

式细胞分析仪和 CLSM 对细胞中的 ROS 进行定量与定性分析。DCFH-DA 自身在细胞中无荧光，但其可被细胞内的酯酶水解，进而与 ROS 反应生成 DCF 并发射绿色荧光，因此可通过分析相对荧光强度及亮度判断细胞中的 ROS 水平。流式细胞仪检测结果见图 12(a)，与空白组相比，经过光照处理的 NGT NPs 产生的 ROS 升高水平极其显著（P<0.001），明显高于未经光照处理的 NGT NPs。CLSM 结果见图 12(b)，经光照处理的 NGT NPs 在 B16 细胞中发出蓝色荧光，可用于细胞成像及载体的示踪。空白组及未经光照处理的 NGT NPs 组仅产生微弱的绿色荧光；而经光照处理的 NGT NPs 发射出明显的绿色荧光。结果表明，NGT NPs 经光照处理后可在 B16 细胞中产生大量 ROS，有望实现良好的 PDT 效果。



—P<0.01；*—P<0.001。

(a) ROS相对荧光强度　　(b) CLSM图

图 12　不同样品在 B16 细胞内产生 ROS 的水平

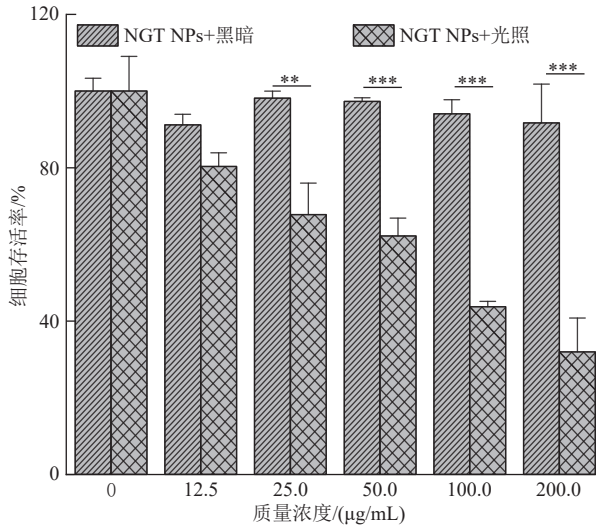
Fig. 12　ROS produced by B16 cells stimulated by different samples

2.7　NGT NPs 体外光动力抗肿瘤活性评估

将 B16 细胞与 NGT NPs 共培养 24 h，检测 NGT NPs 在光照及黑暗条件下对肿瘤细胞的毒性，见图 13。黑暗处理的细胞存活率均在 90% 以上，即使经 200 μg/mL 的 NGT NPs 处理后，B16 细胞存活率也未出现显著降低，表明 NGT NPs 在黑暗条件下对细胞无明显毒性。然而，在光照组中，随着 NGT NPs 质量浓度升高，细胞存活率逐渐下降，最低至 36%，说明 NGT NPs 仅在光照条件下对细胞产生毒性，具有光响应选择性，展现出良好的 PDT 效果。

2.8　AM/PI 染色结果

AM/PI 双荧光染色常用于检测细胞活力和



—$P<0.01$；*—$P<0.001$。

图 13　NGT NPs 与 B16 细胞共同孵育后的细胞存活率

Fig. 13　Survival rate of B16 cells incubated with NGT NPs

凋亡状态，其中 AM 可将活细胞染成绿色，PI 可将坏死及凋亡后期的细胞染成红色。为进一步验证 NGT NPs 的光动力抗肿瘤效果，采用 AM/PI 双染色对不同组别的 B16 细胞进行染色，通过 CLSM 观察染色情况，并结合红绿荧光的强度及细胞数量评估细胞存活的状况，见图 14。空白组绿色荧光饱满、红色荧光较弱，表明细胞状态良好；经药物处理后，红色荧光逐渐增强，表明 B16 细胞活力逐渐降低；光照处理后的 NGT NPs 组细胞死亡数量最多，表明 NGT NPs 具有良好的光动力抗肿瘤效果，该结果与 CCK-8 试验结果一致。

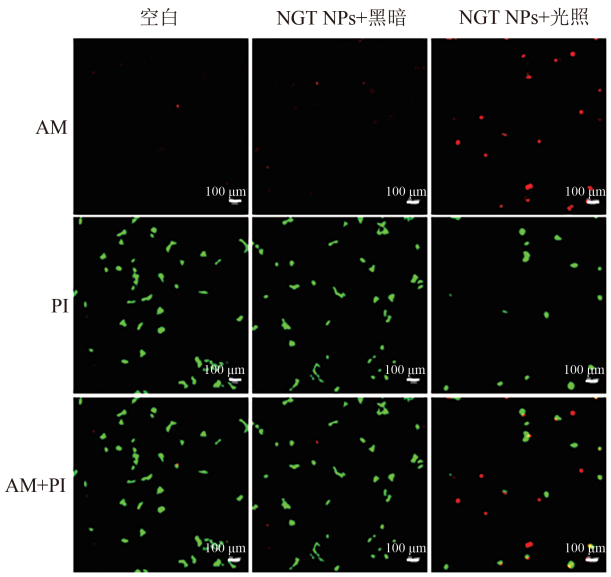


图 14　不同处理组 B16 细胞的 AM/PI 染色结果

Fig. 14　AM/PI staining results of B16 cells in different treatment groups

3　结论

作者通过静电作用合成了由 NG 和光敏剂 TTVBA 形成的纳米粒子 NGT NPs。NGT NPs 与 TTVBA 具有相同的光敏剂特性，在光照条件下不仅可在细胞中产生大量的 ROS，还能实现细胞成像功能。NGT NPs 的平均粒径为 104.8 nm，表面电位为 23.83 mV。CCK-8 结果表明，光照条件下 NGT NPs 可显著抑制 B16 细胞增殖，且抑制效果呈剂量依赖性。AM/PI 染色试验结果表明，光照条件下 NGT NPs 可有效杀死 B16 细胞。

参考文献

[1] SHELEG S V, ZHAVRID E A, KHODINA T V, et al. Photodynamic therapy with chlorin e_6 for skin metastases of melanoma[J]. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, 2004, 20(1): 21-26.

[2] DAI J, WU M, WANG Q, et al. Red blood cell membrane-camouflaged nanoparticles loaded with AIEgen and Poly (I:C) for enhanced tumoral photodynamic-immunotherapy [J]. National Science Review, 2021, 8(6): nwab039.

[3] CORREIA J H, RODRIGUES J A, PIMENTA S, et al. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions [J]. Pharmaceutics, 2021, 13(9): 1332.

[4] KWIATKOWSKI S, KNAP B, PRZYSTUPSKI D, et al. Photodynamic therapy-mechanisms, photosensitizers and combinations[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 106: 1098-1107.

[5] GAI S L, YANG G X, YANG P P, et al. Recent advances in functional nanomaterials for light-triggered cancer therapy[J]. Nano Today, 2018, 19: 146-187.

[6] MASTER A, LIVINGSTON M, SEN GUPTA A. Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: perspectives and challenges [J]. Journal of Controlled Release, 2013, 168(1): 88-102.

[7] XIAO Q Q, LI X T, LI Y, et al. Biological drug and drug delivery-mediated immunotherapy [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2021, 11(4): 941-960.

[8] SAHDEV P, OCHYL L J, MOON J J. Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems[J]. Pharmaceutical Research, 2014, 31(10): 2563-2582.

[9] HU X K, YANG G Y, CHEN S, et al. Biomimetic and bioinspired strategies for oral drug delivery [J]. Biomaterials Science, 2020, 8(4): 1020-1044.

[10] HAN Y N, HU B, WANG M Y, et al. pH-Sensitive tumor-targeted hyperbranched system based on glycogen nanoparticles for liver cancer therapy [J]. Applied Materials Today, 2020, 18: 100521.

[11] MELÉNDEZ R, MELÉNDEZ-HEVIA E, CANELA E I. The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize cell metabolism[J]. Biophysical Journal, 1999, 77(3): 1327-1332.

[12] MORRIS G A, ANG S, HILL S E, et al. Molar mass and solution conformation of branched α(1→4), α(1→6) glucans. Part I: glycogens in water[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(1): 101-108.

[13] 张成, 吕雪芹, 金柯, 等. 改造细胞质膜促进途径酶组装及*N*-乙酰氨基葡萄糖合成[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(10): 7-15.
ZHANG C, LYU X Q, JIN K, et al. Engineering plasma membrane to promote enzyme assembly and *N*-acetylglucosamine synthesis[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(10): 7-15. (in Chinese)

[14] BESFORD Q A, CAVALIERI F, CARUSO F. Glycogen as a building block for advanced biological materials[J]. Advanced Materials, 2020, 32(18): 1904625.

[15] PERRONE M, LOPALCO A, LOPEDOTA A, et al. Preactivated thiolated glycogen as mucoadhesive polymer for drug delivery[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2017, 119: 161-169.

[16] ENGELBERTH S A, HEMPEL N, BERGKVIST M. Cationic dendritic starch as a vehicle for photodynamic therapy and siRNA co-delivery [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2017, 168: 185-192.

[17] SULLIVAN M A, VILAPLANA F, CAVE R A, et al. Nature of α and β particles in glycogen using molecular size distributions[J]. Biomacromolecules, 2010, 11(4): 1094-1100.

[18] 邓淑豪, 赖莉, 王志清, 等. 糖原作为新型基因载体的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(5): 38-45.
DENG S H, LAI L, WANG Z Q, et al. Glycogen as novel gene vector[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(5): 38-45. (in Chinese)

[19] 孙嘉笛, 高璐, 张银志, 等. 基于毒性效应通路荧光细胞传感模型的T-2毒素毒性筛查[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(12): 35-43.
SUN J D, GAO L, ZHANG Y Z, et al. T-2 toxicity screening based on fluorescence cell sensing model *via* toxic effect pathway[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(12): 35-43. (in Chinese)

[20] WANG H H, PAN X H, WANG Y Q, et al. A new class of nitrobenzoic acid-based AIE photosensitizers for highly efficient photodynamic antibacterial therapy[J]. Science China Materials, 2021, 64(10): 2601-2612.

（责任编辑：刘冬梅）