超小型锰掺杂金纳米簇及微环境响应的肿瘤可视化诊疗

孙思佳, 吴頔, 张贾鹤, 范敏菲, 曾乐勇*

药物化学与分子诊断教育部重点实验室, 河北省化学生物学重点实验室, 河北大学化学与环境科学学院, 保定 071002

*通讯作者, E-mail: zengly@hbu.cn

收稿日期: 2021-05-19; 接受日期: 2021-06-21; 网络版发表日期: 2021-08-30

国家自然科学基金(编号: 51772074, U1732127, U20A20254)、河北省杰出青年科学基金(编号: C2020201025)、河北大学多学科交叉研究项目(编号: DXK202002)和河北大学大学生创新创业训练项目(编号: 2021362)资助

摘要 超小尺寸的无机纳米探针具有肾脏可清除的优点, 对于实现临床应用意义重大. 本文制备了超小尺寸的 Mn^{2+} 掺杂金纳米簇(Mn-AuNCs), 实现了对乳腺癌的磁共振成像(MRI)以及肿瘤微环境响应的化学动力学治疗(CDT)和光动力治疗(PDT). 结果表明, Mn-AuNCs 纳米探针的尺寸约为 2~3 nm, 具有优异的 T_1 -加权 MRI 性能, 纵向弛豫效率高达 $31.71 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. 在肿瘤微环境中, Mn-AuNCs 纳米探针催化过氧化氢产生有毒的羟基自由基、氧气和单线态氧, 具有 CDT 和增强的 PDT 性能. 在 635 nm 激光辐照下, CDT/PDT 联合作用使 4T1 细胞存活率降至 10%, 肿瘤完全消失且不复发, 实现了 MRI 引导下的 CDT/PDT 联合治疗.

关键词 锰掺杂金纳米簇, 超小纳米探针, 肿瘤微环境, 磁共振成像, 化学动力学治疗, 光动力治疗

1 引言

癌症是危害人类生命的重大疾病. 目前, 临床常用的手术、放/化疗等治疗模式存在治疗不彻底、副作用大等缺点. 近年来, 光动力学治疗(PDT)因其定位准确、剂量可控、副作用小等优点被广泛研究和应用^[1]. 但是, PDT 需要外部能量激励和氧气(O_2)参与, 激光穿透深度有限, 且肿瘤微环境缺氧以及高浓度的谷胱甘肽(GSH)清除活性氧自由基(ROS)限制了 PDT 的疗效^[2]. 步文博等^[3-5]在国际上较早地开展了化学动力学治疗(CDT)的研究, 它是通过催化肿瘤微环境中高浓度的过氧化氢(H_2O_2)发生芬顿或类芬顿反应产生毒性

更高的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)诱导细胞凋亡. CDT 无需外部激励且不受组织穿透性限制, 是一种性能更加优异的治疗模式. 而且, CDT 过程产生的 O_2 可以改善肿瘤乏氧, 提高 PDT 疗效^[6]. 因此, 利用纳米材料与肿瘤微环境相互作用的特点, 构建肿瘤微环境响应的 CDT/PDT 双功能纳米探针对于提高肿瘤的治疗效果具有重要的科学意义和临床应用价值^[7].

作为一类具有类酶催化活性的纳米结构材料, 纳米酶可以催化肿瘤微环境中的内源性物质提供 CDT 和 PDT 所需的 H_2O_2 和 O_2 , 提高纳米探针的诊疗性能^[8]. 阎锡蕴等^[9]在国际上最早提出了纳米酶的概念并将其应用于诊疗、传感、抗菌等多个领域. 目前, 基于铁、铜

引用格式: Sun S, Wu D, Zhang J, Fan M, Zeng L. Manganese-doped gold nanoclusters with ultrasmall size and microenvironment-responsive visualized theranostics of tumor. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 1259–1268, doi: 10.1360/SSC-2021-0122

和锰等金属离子的纳米酶在肿瘤微环境响应的CDT/PDT中研究较多^[10-12]。无机纳米材料具有优异的磁、光、电、声和热等响应特性, 可以作为智能响应型纳米酶, 在肿瘤可视化诊疗中显示出潜在的应用前景^[13]。Hyeon等^[14]构建了O₂自产生的MnFe₂O₄纳米酶, 催化肿瘤微环境中的H₂O₂持续产生O₂, 提高了单线态氧(¹O₂)的产率并增强了PDT性能。陈小元等^[15]报道了GSH响应的MnO₂基纳米酶, MnO₂消耗GSH, 可提高细胞的氧化应激水平, 产生的Mn²⁺将H₂O₂转化为更毒的·OH增强了CDT。侯仰龙等^[16]构建了肿瘤穿膜肽包裹的Ag₂S@Fe₂C纳米酶系统, 利用其光热治疗(PTT)和增强的CDT可实现对乳腺癌的强化联合治疗。林君、杨飘萍等^[17]以及刘惠玉等^[18]分别报道了具有双重酶催化活性的纳米酶, 不仅可提高氧化应激和缓解乏氧, 而且利用光热效应协同改善了纳米酶的催化活性。李琳琳、步文博等^[19]报道了自组装铜-氨基酸纳米酶, 可实现依次响应GSH和H₂O₂增强的CDT。

然而, 目前报道的肿瘤微环境响应型无机纳米酶大多尺寸较大, 代谢困难, 长期累积在体内对健康和生命造成了潜在威胁, 成为阻碍无机纳米探针临床应用的关键因素之一。研究表明, 超小尺寸的纳米粒子可以经肾脏代谢排出体外^[20]。2016年, 陈春英等^[21]报道了超小尺寸的Cu₃BiS₃纳米点用于肿瘤的光声/CT成像诊断和PTT, 并实现了体内快速降解和肾脏清除。

金属纳米簇是由若干金属原子结合成的超小尺寸纳米团簇, 其尺寸在3~5 nm, 体内滞留时间短, 可经肾脏排出体外, 而且性能稳定、生物相容性好。特别是, 金纳米簇(AuNCs)不但具有可肾脏代谢的优点, 而且具有PDT性能, 是一种有潜在的临床应用前景的光敏剂^[22-24]。因此, 以AuNCs为基本单元, 构建肿瘤微环境响应的超小纳米探针对于提高CDT/PDT性能以及安全性具有重要意义。因此, 本文利用还原法制备了牛血清白蛋白(BSA)保护的超小尺寸AuNCs, 将Mn²⁺与BSA螯合构建Mn²⁺掺杂的AuNCs (Mn-AuNCs)纳米探针, 实现了磁共振成像(MRI)和肿瘤微环境响应的CDT/PDT联合治疗。在肿瘤微酸性环境中, Mn²⁺与高浓度的H₂O₂反应产生·OH发挥CDT功能, 同时产生O₂可改善肿瘤乏氧, 增强了AuNCs的PDT功能。本文系统研究了Mn-AuNCs的·OH和¹O₂的产生性能, 评价了Mn-AuNCs的体内外生物相容性; 以4T1乳腺癌为模型, 验证了Mn-AuNCs的体内外MRI和CDT/PDT性能。

因此, 本工作构建了肿瘤微环境响应的、具有MRI和CDT/PDT功能的Mn-AuNCs纳米探针, 对于发展具有临床转化前景的可代谢超小无机纳米探针具有重要的意义和价值。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

四水合氯金酸(HAuCl₄·4H₂O)、氢氧化钠(NaOH)和多聚甲醛购自国药集团有限公司(中国)。BSA、无水氯化锰(MnCl₂)、二甲基亚砜(DMSO)、1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)、噻唑蓝(MTT)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和三(4, 7-联苯-1, 10-邻菲罗啉)二氯化钇(RDPP)购自阿拉丁试剂有限公司(中国)。胎牛血清(FBS)、细胞培养基(RPMI-1640)、胰蛋白酶(Trypsin)、Triton X-100、Hoechst 33258和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鬼笔环肽购自索莱宝科技有限公司(中国)。所有试剂均为分析纯, 没有进一步纯化。

Tecnai F20透射电子显微镜(美国FEI公司)、Lambda 365紫外-可见(UV-vis)分光光度计(韩国PerkinElmer公司)、F-4600荧光分光光度计(日本Hitachi公司)、NICOLET傅里叶变换红外光谱仪(美国Thermo公司)、AXIS Supra X射线光电子能谱仪(英国Kratos公司)、MesoMR23-060H-1MRI分析仪(苏州纽迈分析仪器有限公司)、TCS SP5激光扫描共聚焦显微镜(德国Zeiss公司)、imark 168-1130酶标仪(美国Biorad公司)和Ingenia 3.0 T MRI扫描仪(荷兰Philips公司)。

2.2 Mn-AuNCs的制备

AuNCs的制备。AuNCs的制备参考先前报道的方法^[25]。将50 mg的BSA溶于5 mL水中, 在37℃条件下剧烈搅拌, 随后缓慢滴加5 mL的HAuCl₄·4H₂O溶液(10 mM)。5 min后, 加入600 μL的NaOH溶液(1 M)调节溶液的pH至12左右。反应12 h后, 对其进行透析12 h得到AuNCs溶液。

Mn-AuNCs的制备。量取10 mL AuNCs (500 μg/mL)溶液置于20 mL小瓶中。在搅拌条件下滴加200 μL的MnCl₂溶液(50 mM)。在室温条件下搅拌4 h后, 对其进行透析12 h得到Mn-AuNCs溶液。

2.3 MRI、 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2 和 $^1\text{O}_2$ 产生性能测试

MRI性能测试. 使用0.5 T的MRI扫描仪对Mn-AuNCs的MRI以及弛豫性能进行测试. 配制不同浓度的Mn-AuNCs溶液(Mn^{2+} : 0、0.05、0.10、0.15、0.20和0.25 mM), 分别测定MRI和弛豫时间(T_1 和 T_2), 并绘制 Mn^{2+} 浓度与 $1/T_1$ 和 $1/T_2$ 的关系曲线, 计算得到纵向(r_1)和横向(r_2)弛豫率.

$\cdot\text{OH}$ 产生性能测试. 使用TMB检测 $\cdot\text{OH}$ 的产生情况. 在1 mL PBS (pH 6.5)中加入5 μL 的 H_2O_2 (10 mM)、100 μL TMB溶液(3.2 mM)和50 μL Mn-AuNCs溶液(500 $\mu\text{g/mL}$). 在37°C水浴中反应0、5、10、15、20、25和30 min后, 测定溶液的UV-vis吸收光谱评价Mn-AuNCs产生 $\cdot\text{OH}$ 的能力. 此外, 在37°C水浴中的反应时间为30 min, 通过改变加入的 H_2O_2 浓度(0、5、10、15、20和25 mM), 研究了 H_2O_2 浓度对 $\cdot\text{OH}$ 产生的影响.

O_2 产生性能测试. 使用RDPP检测 O_2 的产生能力. 在1 mL PBS (pH 7.4和6.5)中加入50 μL Mn-AuNCs溶液(500 $\mu\text{g/mL}$), 再各加入5 μL 的 H_2O_2 溶液(10 mM)和100 μL 的RDPP溶液(10 mM). 吹打均匀后, 反应不同时间(0、10、20、30、40、50和60 min)后, 测定溶液的荧光光谱评价Mn-AuNCs产生 O_2 的能力. 此外, 与上述相同条件下, 测量单独的磷酸盐缓冲溶液(PBS) (pH 6.5和7.4)和AuNCs溶液与RDPP反应60 min的荧光光谱.

$^1\text{O}_2$ 产生性能测试. 使用DPBF检测 $^1\text{O}_2$ 的产生情况. 分别取1 mL Mn-AuNCs (250 $\mu\text{g/mL}$)和Mn-AuNCs + H_2O_2 (H_2O_2 浓度为100 μM)乙醇溶液置于比色皿中, 各加入20 μL 的DPBF溶液(5 mg/mL). 吹打均匀后, 用635 nm激光器(50 mW/cm^2)照射不同时间(0、5、10和15 min). 待光照结束后, 立即离心, 并测定上层清液的UV-vis吸收光谱, 绘制光照时间与DPBF吸光度的关系曲线. 此外, 635 nm激光的功率密度为50 W/cm^2 , 改变Mn-AuNCs + H_2O_2 (H_2O_2 浓度为100 μM)的浓度(50、100、150和200 $\mu\text{g/mL}$), 分别照射不同时间(0、5、10和15 min), 研究了不同浓度Mn-AuNCs的 $^1\text{O}_2$ 产生情况.

2.4 细胞摄取与细胞成像测试

细胞摄取性能测试. 在含5% CO_2 的37°C培养箱中培养鼠源乳腺癌细胞4T1, 所使用的培养基为RPMI-1640 (含有10%胎牛血清和1%双抗)培养基. 将处于对

数生长期的4T1细胞接种至培养皿中, 每皿接种约 1×10^5 个细胞. 培养24 h后, 将原培养基吸出, 加入含有AuNCs和Mn-AuNCs (50 $\mu\text{g/mL}$)的培养基, 孵育时间为8 h. 加入100 μL Hoechst (5 $\mu\text{g/mL}$)和50 μL 的FITC标记的鬼笔环肽(50 $\mu\text{g/mL}$)进行细胞核(蓝色)和细胞质(绿色)染色. 最后, 使用激光扫描共聚焦显微镜进行观察(Hoechst: 405 nm激发; FITC: 488 nm激发; Mn-AuNCs: 520 nm激发).

细胞MRI性能测试. 首先, 将 1×10^5 个4T1细胞接种在培养皿中培养24 h. 然后, 用培养基配制不同浓度的Mn-AuNCs溶液(Mn^{2+} : 0、0.05、0.10、0.15、0.20和0.25 mM), 并与细胞孵育4 h. 最后, 将细胞酶解下来并固定在1 mL的1%琼脂糖中, 使用0.5 T的MRI扫描仪进行 T_1 -加权的MRI性能测试.

2.5 体外PDT和CDT性能测试

体外CDT性能测试. 将 1×10^4 个4T1细胞接种在96孔板中. 培养24 h后, 将原培养基吸出, 分别加入1 mL含AuNCs和Mn-AuNCs (0、15、30、45和60 $\mu\text{g/mL}$)的培养基(pH 6.5, H_2O_2 浓度为100 μM). 孵育20 h后, 加入10 μL 的MTT (5 mg/mL)继续孵育4 h. 最后, 将培养基吸出, 加入200 μL DMSO, 充分振荡后, 通过酶标仪测量溶液吸光度并计算细胞的存活率. 此外, 在不加入 H_2O_2 的条件下, 分别将AuNCs和Mn-AuNCs在pH 7.4的培养基中与4T1细胞孵育, 通过酶标仪测量溶液吸光度并计算细胞的存活率.

体外PDT/CDT性能测试. 将 1×10^4 个4T1细胞接种在96孔板中. 培养24 h后, 将原培养基吸出, 分别加入1 mL含AuNCs和Mn-AuNCs (0、15、30、45和60 $\mu\text{g/mL}$)的培养基(pH 6.5, H_2O_2 浓度为100 μM). 孵育4 h后, 利用635 nm激光(50 mW/cm^2)照射5 min. 共孵育16 h后, 加入10 μL 的MTT (5 mg/mL), 继续孵育4 h. 最后, 将培养液吸出, 分别加入200 μL 的DMSO, 充分振荡后, 通过酶标仪测定溶液吸光度并计算细胞的存活率. 而且在不加入 H_2O_2 的条件下, 分别将AuNCs和Mn-AuNCs在pH 7.4的培养基中与4T1细胞孵育并进行激光辐照, 通过酶标仪测量溶液吸光度并计算细胞的存活率.

2.6 体内生物相容性和MRI/CDT/PDT性能测试

体内生物相容性测试. 分别将100 μL 生理盐水和

Mn-AuNCs (500 $\mu\text{g/mL}$)通过尾静脉注射到健康裸鼠体内。两周后将其处死, 切除主要脏器(心、肝、脾、肺和肾)浸泡至4%的多聚甲醛中, 进行苏木精-伊红(H&E)染色。利用光学显微镜观察和拍摄H&E染色图像。

4T1乳腺癌模型建立。在RPMI-1640培养基中大量培养4T1细胞, 将细胞离心并分散在PBS中(5×10^6 个/ mL), 取100 μL 注射到裸鼠背部皮下进行成瘤。当肿瘤尺寸增长到40~80 mm^3 时, 进行MRI和CDT/PDT实验。

体内MRI性能测试。将100 μL Mn-AuNCs (500 $\mu\text{g/mL}$)通过尾静脉注射到4T1荷瘤裸鼠体内。分别在注射前(0 min)以及注射后30和120 min时使用3.0 T的MRI扫描仪进行 T_1 -加权的MRI测试。

体内PDT/CDT性能测试。将4T1荷瘤裸鼠随机分为5组: (1) 生理盐水组; (2) 生理盐水+激光组; (3) Mn-AuNCs组; (4) AuNCs+激光组; (5) Mn-AuNCs+激光组。其中生理盐水组和生理盐水+激光组经尾静脉注射100 μL 生理盐水, 其余各组分别注射100 μL AuNCs和Mn-AuNCs (500 $\mu\text{g/mL}$)。注射12 h后, 利用635 nm激光(50 mW/cm^2)照射肿瘤部位5 min。在15天的治疗期内, 每2天记录一次肿瘤大小, 并绘制变化曲线。另外, 还监测了五组裸鼠的存活率。

3 结果与讨论

3.1 Mn-AuNCs的制备与表征

首先, 对Mn-AuNCs的形貌进行了表征。图1a, b为透射电子显微镜(TEM)和高分辨TEM (HRTEM)图像, 可以看出, Mn-AuNCs的分散性良好且尺寸均一, 粒径大小约为2~3 nm。从图1b的HRTEM图中可以看到明显的晶格条纹, 晶面间距为0.24 nm, 对应于面心立方结构金单质的(111)晶面^[26], 表明Mn-AuNCs具有良好的结晶度。利用纳米粒度与Zeta电位分析仪对Mn-AuNCs的粒径分布和Zeta电位进行表征。图1c为动态光散射(DLS)曲线, Mn-AuNCs的平均粒径约为(3 ± 0.5) nm, 与TEM结果一致。从图1d可以看出, Mn-AuNCs的Zeta电位为-31.5 mV, 这是由于BSA修饰的AuNCs表面有大量带负电的羧基, 而 Mn^{2+} 螯合在BSA中, 其表面仍存在大量羧基。

采用X射线光电子能谱(XPS)对AuNCs和Mn-AuNCs的元素组成进行表征。如图2a所示, 在AuNCs和

图1 Mn-AuNCs的TEM (a)、HRTEM (b)、DLS (c)和Zeta (d)电位图

Figure 1 TEM (a), HRTEM (b), DLS (c), and Zeta potential (d) of Mn-AuNCs.

Mn-AuNCs的XPS全谱中均有C 1s、N 1s、O 1s和Au 4f的特征峰; 而在Mn-AuNCs的全谱中, 640 eV处观察到了Mn 2p的特征峰, 证明Mn元素成功掺杂到了Mn-AuNCs中。为了进一步验证Mn-AuNCs的化学结构, 对Au 4f和Mn 2p轨道进行了拆分。如图2b所示, Au 4f光谱可以分为Au 4f_{7/2}和Au 4f_{5/2}两个特征峰, 结合能分别为84.0和87.9 eV, 表明零价金元素的存在^[27]。而在Mn-AuNCs的Mn 2p谱图(图2c)中, Mn元素被分为Mn 2p_{3/2}和Mn 2p_{1/2}两个特征峰, 说明 Mn^{2+} 的存在, 并与O形成了Mn→O的配位键^[28], 这是由于BSA可以通过蛋白质骨架中的酰胺基团和硫醇基团的协同作用对 Mn^{2+} 进行螯合^[29]。

利用傅里叶变换红外(FTIR)光谱对AuNCs和Mn-AuNCs的表面官能团进行了表征。如图2d所示, 在AuNCs的FTIR光谱图中清晰地显示了BSA的特征振动峰, 其中3410 cm^{-1} 处的宽带属于N-H键的拉伸振动^[30], 位于2960和2870 cm^{-1} 的两个特征峰是由于C-H键拉伸振动产生的^[31], 在1650和1540 cm^{-1} 处的两个特征峰归因于C=O键的拉伸振动和C=N键的拉伸振动, 这两种化学键均与蛋白质的二级结构有关^[32], 1070 cm^{-1} 处的特征峰属于酰胺基团。而在Mn-AuNCs的FTIR光谱图中, 1070 cm^{-1} 处的特征峰消失了, 这是由于 Mn^{2+} 与酰胺基团和羧基偶联导致的, 证明 Mn^{2+} 可稳定螯合

图2 AuNCs和Mn-AuNCs的XPS和FTIR图。(a) AuNCs和Mn-AuNCs的XPS全谱;(b) Mn-AuNCs的Mn 2p轨道XPS谱;(c) Mn-AuNCs的Au 4f 轨道XPS谱; AuNCs和Mn-AuNCs的FTIR谱(d), UV-vis吸收光谱(e)和激发和发射光谱(f)(网络版彩图)

Figure 2 XPS and FTIR spectra of AuNCs and Mn-AuNCs. (a) XPS full spectra of AuNCs and Mn-AuNCs; (b) Mn 2p XPS spectrum of Mn-AuNCs; (c) Au 4f XPS spectrum of Mn-AuNCs; (d) FTIR spectra, (e) UV-vis absorption spectra, (f) excitation and emission spectra of AuNCs and Mn-AuNCs (color online).

于BSA中^[31]。

利用UV-Vis分光光度计对AuNCs和Mn-AuNCs的UV-vis吸收光谱进行测定。结果如图3e所示, AuNCs和Mn-AuNCs的吸收光谱相似, 在450~600 nm范围内具有吸收带。此外, 利用荧光分光光度计对AuNCs和Mn-AuNCs的激发和发射光谱进行测定。结果如图3f所示, AuNCs和Mn-AuNCs的激发和发射光谱形状相同, 最佳激发波长为500 nm, 相同浓度的AuNCs和Mn-AuNCs的荧光发射强度基本一致, 发射峰均位于670 nm处。

3.2 $\cdot\text{OH}$ 和 $^1\text{O}_2$ 产生性能评价

以TMB为底物, 利用UV-vis吸收光谱研究了 $\cdot\text{OH}$ 的产生能力。如图3a所示, 随着反应时间增加, TMB在650 nm处的吸光度明显增强, 表明Mn-AuNCs催化 H_2O_2 能产生 $\cdot\text{OH}$, 且产生量与反应时间成正比。此外, 通过改变体系中的 H_2O_2 浓度, 发现 H_2O_2 的含量越高, Mn-AuNCs产生的 $\cdot\text{OH}$ 越多, 证明Mn-AuNCs在 H_2O_2 存

在条件下具有良好的产生 $\cdot\text{OH}$ 的性能(图3b)。

以RDPP作为 O_2 捕捉剂, 利用RDPP与 O_2 反应使RDPP荧光淬灭的性质, 通过测量其荧光光谱研究Mn-AuNCs的 O_2 产生能力。如图3c所示, 随着反应时间的增加, RDPP的荧光强度明显降低, 反应30和60 min的 O_2 产率分别为36.0%和65.4%。此外, 固定反应时间为60 min, 测量不同pH下单独PBS和AuNCs孵育的RDPP的荧光光谱。结果如图3d所示, 可以看出, 除了Mn-AuNCs在酸性 H_2O_2 条件下可以产生 O_2 外, 其他均未观察到 O_2 产生, 表明 Mn^{2+} 具有 H_2O_2 酶活性, 产生的 O_2 可以进一步提高PDT性能^[33]。

以DPBF作为 $^1\text{O}_2$ 捕捉剂, 利用UV-vis吸收光谱对Mn-AuNCs在635 nm激光照射下的 $^1\text{O}_2$ 产生能力进行评价。图3e是在635 nm激光照射下不同材料孵育DPBF溶液的吸光度(归一化)变化曲线, 可以看出在15 min内, 在不含 H_2O_2 的中性环境中, Mn-AuNCs的 $^1\text{O}_2$ 产率约为47.5%; 而在含有 H_2O_2 的微酸性环境中, $^1\text{O}_2$ 产率高达95.0%, 说明 Mn^{2+} 在酸性条件下催化 H_2O_2 产生 O_2

图3 Mn-AuNCs的 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2 和 $^1\text{O}_2$ 产生性能。(a) Mn-AuNCs孵育TMB的UV-vis吸收光谱; (b) 加入不同浓度 H_2O_2 时Mn-AuNCs孵育TMB的UV-vis吸收光谱; (c) Mn-AuNCs孵育RDPP的荧光光谱(pH 6.5, H_2O_2); (d) 不同样品孵育RDPP的荧光光谱(H_2O_2); (e) 在635 nm激光辐照下Mn-AuNCs孵育DPBF的吸光度(归一化)变化曲线; (f) 在635 nm激光辐照下不同浓度Mn-AuNCs (pH 6.5, H_2O_2)孵育DPBF的吸光度(归一化)变化曲线(网络版彩图)

Figure 3 $\cdot\text{OH}$ 和 $^1\text{O}_2$ generation performances of Mn-AuNCs. (a) UV-vis absorption spectra of TMB incubated with Mn-AuNCs; (b) UV-vis absorption spectra of TMB incubated with Mn-AuNCs by adding different H_2O_2 concentrations; (c) fluorescence spectra of RDPP incubated with Mn-AuNCs (pH 6.5, H_2O_2); (d) fluorescence spectra of RDPP incubated with different samples (H_2O_2); (e) absorbance change curves of DPBF incubated with Mn-AuNCs by irradiating 635 nm laser; (f) absorbance change curves of DPBF incubated with Mn-AuNCs (pH 6.5, H_2O_2) in different concentrations by irradiating 635 nm laser (color online).

进而增强了Mn-AuNCs的 $^1\text{O}_2$ 产生性能。进一步, 改变Mn-AuNCs浓度, 发现 $^1\text{O}_2$ 产率与Mn-AuNCs浓度成正比, 当Mn-AuNCs浓度由50 $\mu\text{g/mL}$ 增加到200 $\mu\text{g/mL}$ 时, $^1\text{O}_2$ 产率可以从51.2%提高到85.3% (图3f)。以上结果表明Mn-AuNCs具有优异的肿瘤微环境响应的 $^1\text{O}_2$ 产生能力。

3.3 MRI和细胞摄取性能评价

利用MRI和弛豫分析仪对Mn-AuNCs的MRI和弛豫性能进行表征。如图4a所示, 随着Mn-AuNCs浓度的增加, MRI信号呈现出越来越强的趋势, 表明Mn-AuNCs具有良好的 T_1 -加权MRI效果。图4b为Mn-AuNCs的弛豫曲线图, 计算得出其纵向(r_1)和横向(r_2)弛豫率分别为31.71和91.46 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ 且 r_2/r_1 的比值小于3, 表明Mn-AuNCs纳米粒子可以用作 T_1 -加权的MRI造影剂。此外, 将不同浓度的Mn-AuNCs与4T1细胞共

孵育, 研究了细胞内的MRI性能。如图4c所示, 随着Mn-AuNCs浓度的增加, 4T1细胞中MRI信号逐渐增强, 表

图4 Mn-AuNCs的MRI性能。(a) 不同浓度Mn-AuNCs的 T_1 -加权MRI图; (b) Mn-AuNCs的纵向(r_1)和横向(r_2)弛豫曲线; (c) 不同浓度Mn-AuNCs孵育4T1细胞的 T_1 -加权MRI图(网络版彩图)

Figure 4 MRI performance of Mn-AuNCs. (a) T_1 -weighted MRI images of Mn-AuNCs in different concentrations; (b) longitudinal (r_1) and transversal (r_2) relaxivity curves; (c) T_1 -weighted MRI images of 4T1 cells incubated with Mn-AuNCs in different concentrations (color online).

明Mn-AuNCs可被细胞摄取且具有良好的体外MRI效果。

利用激光扫描共聚焦显微镜研究了Mn-AuNCs的细胞摄取性能。如图5所示, 单独的4T1细胞只在细胞核和细胞质中观察到蓝色和绿色荧光。在与Mn-AuNCs孵育的细胞中, 除了可观测到细胞核的蓝色和细胞质的绿色荧光外, 在细胞质中还观测到了AuNCs的红色荧光, 说明Mn-AuNCs可被细胞摄取。

3.4 体外CDT/PDT性能和体内生物相容性评价

采用MTT法对AuNCs和Mn-AuNCs的CDT和CDT/PDT性能进行了评价。如图6a, c所示, 在无 H_2O_2 的中性环境中, AuNCs和Mn-AuNCs孵育的4T1细胞存活率在93%以上, 说明AuNCs和Mn-AuNCs具有较低的细胞毒性。而在含有 H_2O_2 的微酸性环境中, AuNCs孵育的4T1细胞存活率几乎没有降低, 而Mn-AuNCs孵育的4T1细胞降至42.3%, 这是由于在微酸性条件下,

图5 Mn-AuNCs孵育4T1细胞的激光扫描共聚焦显微镜图(网络版彩图)

Figure 5 Laser scanning confocal microscopy images of 4T1 cells incubated with Mn-AuNCs in different concentrations (color online).

Mn^{2+} 催化 H_2O_2 生成了 $\cdot\text{OH}$ 诱导细胞凋亡, 表明Mn-AuNCs具有优良的体外CDT性能。

在635 nm激光辐照下, 研究了AuNCs和Mn-AuNCs的体外PDT和CDT/PDT性能。如图6b, d所示, 在无 H_2O_2 的中性环境中, AuNCs和Mn-AuNCs孵育的

图6 AuNCs和Mn-AuNCs的体外CDT/PDT性能和体内生物相容性。(a) Mn-AuNCs孵育的4T1细胞存活率; (b) 在635 nm激光辐照下Mn-AuNCs孵育的4T1细胞存活率; (c) AuNCs孵育的4T1细胞存活率; (d) 在635 nm激光辐照下AuNCs孵育的4T1细胞存活率; (e) 注射生理盐水和Mn-AuNCs的健康裸鼠主要脏器(心、肝、脾、肺和肾) H&E染色图(网络版彩图)

Figure 6 *In vitro* CDT/PDT performances and *in vivo* biocompatibility of Mn-AuNCs. (a) Viabilities of 4T1 cells incubated with Mn-AuNCs; (b) viabilities of 4T1 cells incubated with Mn-AuNCs under the irradiation of 635 nm laser; (c) viabilities of 4T1 cells incubated with AuNCs; (d) viabilities of 4T1 cells incubated with AuNCs under the irradiation of 635 nm laser; (e) H&E staining images of major organs (heart, liver, spleen, lung, and kidney) in healthy nude mice injected with saline and Mn-AuNCs (color online).

4T1细胞存活率分别降至41.7%和37.2%，这是由于AuNCs的PDT作用引起的。在含有 H_2O_2 的微酸性环境中，在635 nm激光辐照下，AuNCs孵育的4T1细胞存活率为41.0%，与无 H_2O_2 的中性环境中的结果相差不大，而Mn-AuNCs孵育的4T1细胞存活率降低到10.1%，表明Mn-AuNCs具有良好的CDT/PDT联合治疗性能。

分别以尾静脉注射方式向健康裸鼠体内注射生理盐水和Mn-AuNCs，并对它们的主要脏器进行H&E染色，研究了Mn-AuNCs的体内生物相容性。如图6e所示，与注射生理盐水的裸鼠相比，注射Mn-AuNCs的裸鼠的心、肝、脾、肺和肾等脏器均未见明显的纤维化或损伤情况，表明Mn-AuNCs具有良好的体内生物相容性和安全性。

3.5 体内MRI和CDT/PDT性能评价

通过尾静脉注射方式，研究了Mn-AuNCs的体内 T_1 -加权MRI和CDT/PDT性能。如图7a所示，随着注射时间的增加，肿瘤部位的 T_1 -加权MRI信号明显增强，说明Mn-AuNCs可以在短时间内到达肿瘤部位并实现MRI功能。

通过监测不同组裸鼠的肿瘤尺寸和生存率，研究了Mn-AuNCs的体内CDT/PDT性能。图7b是不同组4T1荷瘤裸鼠的肿瘤体积变化曲线，可以看出，单纯的盐水组和盐水+激光组的肿瘤体积在15天内增大了13倍左右；单纯的CDT组和单纯的PDT组的肿瘤在起始阶段明显变小，但在第7天后肿瘤出现复发，说明单独的CDT和单独的PDT作用均不能完全抑制肿瘤生长；而在CDT/PDT的联合作用下，肿瘤完全消失。此外，图7c给出了55天内不同组裸鼠的生存率曲线，结果显示，CDT/PDT组裸鼠存活率为100%，而其他组裸鼠先后死去。以上结果表明Mn-AuNCs具有优异的体内CDT/PDT性能。

图7 Mn-AuNCs的体内MRI和CDT/PDT性能。(a) 注射Mn-AuNCs后不同时间点的肿瘤 T_1 -加权MRI图；(b) 不同实验组裸鼠的肿瘤尺寸变化曲线(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)；(c) 不同实验组裸鼠的生存率变化曲线(网络版彩图)

Figure 7 In vivo MRI and CDT/PDT performances of Mn-AuNCs. (a) T_1 -weighted MRI images of tumors in different time points of post-injection; (b) tumor volume change curves of 4T1 tumor-bearing nude mice in different experimental groups (* $p<0.05$, ** $p<0.01$); (c) survival rate curves of 4T1 tumor-bearing nude mice in different experimental groups (color online).

4 结论

综上所述，我们构建了肿瘤微环境响应的、尺寸约为2~3 nm的Mn-AuNCs超小纳米探针，实现了对肿瘤的MRI和增强的CDT/PDT。Mn-AuNCs纳米探针表现出优异的 T_1 -加权MRI性能，纵向弛豫效率 r_1 高达 $31.71 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，尾静脉注射120 min后在肿瘤部位显示出强的MRI信号。而且， Mn^{2+} 催化 H_2O_2 生成 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2 ，具有CDT和增强的PDT性能， $^1\text{O}_2$ 产率高达95%。在 50 mW cm^{-2} 的低功率635 nm激光照射下，CDT/PDT联合作用将4T1肿瘤完全治愈，在55天监测期内小鼠存活率为100%。此外，Mn-AuNCs具有良好的生物相容性，是一种安全的肿瘤微环境响应型可视化诊疗纳米探针。

参考文献

- Zhang Y, Xu C, Yang X, Pu K. *Adv Mater*, 2020, 32: 2002661
- Liu JN, Bu W, Shi J. *Chem Rev*, 2017, 117: 6160–6224
- Tang Z, Liu Y, He M, Bu W. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 946–956
- Tang Z, Zhao P, Wang H, Liu Y, Bu W. *Chem Rev*, 2021, 121: 1981–2019
- Chen X, Liu Y, Bu W. *Sci Sin-Chim*, 2020, 50: 159–172 [(in Chinese) [陈小妍, 刘燕颜, 步文博. 中国科学: 化学, 2020, 50: 159–172]
- Ranji-Burachaloo H, Gurr PA, Dunstan DE, Qiao GG. *ACS Nano*, 2018, 12: 11819–11837

- 7 Huai Y, Hossen MN, Wilhelm S, Bhattacharya R, Mukherjee P. *Bioconj Chem*, 2019, 30: 2247–2263
- 8 Huang Y, Ren J, Qu X. *Chem Rev*, 2019, 119: 4357–4412
- 9 Liang M, Yan X. *Acc Chem Res*, 2019, 52: 2190–2200
- 10 Liu J, Wu M, Pan Y, Duan Y, Dong Z, Chao Y, Liu Z, Liu B. *Adv Funct Mater*, 2020, 30: 1908865
- 11 Liu Y, Wu J, Jin Y, Zhen W, Wang Y, Liu J, Jin L, Zhang S, Zhao Y, Song S, Yang Y, Zhang H. *Adv Funct Mater*, 2019, 29: 1904678
- 12 Chen Y, Li ZH, Pan P, Hu JJ, Cheng SX, Zhang XZ. *Adv Mater*, 2020, 32: 2001452
- 13 Yang Y, Zeng W, Huang P, Zeng X, Mei L. *View*, 2021, 2: 20200042888
- 14 Kim J, Cho HR, Jeon H, Kim D, Song C, Lee N, Choi SH, Hyeon T. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 10992–10995
- 15 Lin LS, Song J, Song L, Ke K, Liu Y, Zhou Z, Shen Z, Li J, Yang Z, Tang W, Niu G, Yang HH, Chen X. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 4902–4906
- 16 Wang Z, Li Z, Sun Z, Wang S, Ali Z, Zhu S, Liu S, Ren Q, Sheng F, Wang B, Hou Y. *Sci Adv*, 2020, 6: eabc8733
- 17 Dong S, Dong Y, Jia T, Liu S, Liu J, Yang D, He F, Gai S, Yang P, Lin J. *Adv Mater*, 2020, 32: 2002439
- 18 Li S, Shang L, Xu B, Wang S, Gu K, Wu Q, Sun Y, Zhang Q, Yang H, Zhang F, Gu L, Zhang T, Liu H. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 12624–12631
- 19 Ma B, Wang S, Liu F, Zhang S, Duan J, Li Z, Kong Y, Sang Y, Liu H, Bu W, Li L. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 849–857
- 20 Liu J, Yu M, Zhou C, Zheng J. *Mater Today*, 2013, 16: 477–486
- 21 Liu J, Wang P, Zhang X, Wang L, Wang D, Gu Z, Tang J, Guo M, Cao M, Zhou H, Liu Y, Chen C. *ACS Nano*, 2016, 10: 4587–4598
- 22 Kawasaki H, Kumar S, Li G, Zeng C, Kauffman DR, Yoshimoto J, Iwasaki Y, Jin R. *Chem Mater*, 2014, 26: 2777–2788
- 23 Tao Y, Li M, Ren J, Qu X. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 8636–8663
- 24 Loynachan CN, Soleimany AP, Dudani JS, Lin Y, Najer A, Bekdemir A, Chen Q, Bhatia SN, Stevens MM. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14: 883–890
- 25 Xie J, Zheng Y, Ying JY. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 888–889
- 26 Peng H, Jian M, Deng H, Wang W, Huang Z, Huang K, Liu A, Chen W. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 14929–14934
- 27 Zhou Y, Zeng HC. *J Phys Chem C*, 2016, 120: 29348–29357
- 28 Wang Y, Wang T, Chen X, Xu Y, Li H. *Opt Mater*, 2018, 78: 118–125
- 29 Yan X, Kong D, Jin R, Zhao X, Li H, Liu F, Lin Y, Lu G. *Sens Actuat B-Chem*, 2019, 290: 640–647
- 30 Han Z, Nan D, Yang H, Sun Q, Pan S, Liu H, Hu X. *Sens Actuat B-Chem*, 2019, 298: 126842
- 31 Bhattacharya D, Mishra MK, De G. *J Phys Chem C*, 2017, 121: 28106–28116
- 32 Le Guével X, Hötzer B, Jung G, Schneider M. *J Mater Chem*, 2011, 21: 2974
- 33 Jia Q, Ge J, Liu W, Zheng X, Chen S, Wen Y, Zhang H, Wang P. *Adv Mater*, 2018, 30: 1706090

Manganese-doped gold nanoclusters with ultrasmall size and microenvironment-responsive visualized theranostics of tumor

Sijia Sun, Di Wu, Jiahe Zhang, Minfei Fan, Leyong Zeng*

Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis of the Ministry of Education, Institute of Life Science and Green Development, Chemical Biology Key Laboratory of Hebei Province, College of Chemistry & Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China

*Corresponding author (email: zengly@hbu.cn)

Abstract: Inorganic nanoprobe with ultrasmall size have the advantage of kidney clearance, which was very meaningful for achieving clinical application. In this article, Mn^{2+} -doped gold nanoclusters (Mn-AuNCs) with ultrasmall size were synthesized, by which magnetic resonance imaging (MRI) and tumor-microenvironment-responsive chemodynamic therapy (CDT) and photodynamic therapy (PDT) were achieved. The results showed that Mn-AuNCs nanoprobe occupied ultrasmall size of about 2–3 nm, and excellent T1-weighted MRI performance with a high longitudinal relaxivity of $31.71 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In tumor microenvironment, Mn-AuNCs nanoprobe can catalyze H_2O_2 to produce $\cdot\text{OH}$, O_2 and singlet oxygen, showing CDT and enhanced PDT performances. Under the irradiation of 635 nm laser, the viability of 4T1 cells incubated with Mn-AuNCs was decreased to be 10%, and tumors disappeared completely, achieving MRI-guided CDT/PDT combination therapy.

Keywords: manganese-doped gold nanoclusters, ultrasmall nanoprobe, tumor microenvironment, magnetic resonance imaging, chemodynamic therapy, photodynamic therapy

doi: [10.1360/SSC-2021-0122](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0122)