第694次学术讨论会·用于硼中子俘获肿瘤治疗的含硼药物

偶联阿霉素 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒的制备及其在联合硼中子俘获治疗/化疗中的应用

张玉财¹, 周琪怡¹, 陈俊阳^{2,3}, 童剑飞^{2,3}, 梁天骄^{2,3}, 赵利^{1*}

1. 苏州大学放射医学与防护学院, 放射医学与辐射防护国家重点实验室, 江苏高校放射医学协同创新中心, 苏州 215123;

2. 中国科学院高能物理研究所, 北京 100049;

3. 散裂中子源科学中心, 东莞 523803

* 联系人, E-mail: lizhao@suda.edu.cn

2021-08-30 收稿, 2021-11-24 修回, 2021-11-28 接受, 2021-11-29 网络版发表

放射医学与辐射防护国家重点实验室创新项目(GZC00102)资助

摘要 硼中子俘获治疗(boron neutron capture therapy, BNCT)是一种二元靶向肿瘤治疗方法, 研发新型多功能硼药是提高BNCT疗效的关键. 本研究通过对 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒进行表面化学修饰制备了一种新型多功能纳米硼药. 首先在 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒表面接枝超支化聚丙三醇(PG), 然后通过pH敏感的脰键偶联阿霉素(DOX), 得到纳米硼药 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX. PG层的高亲水性使 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX在水溶液中具有较好的分散性和稳定性; 而DOX单元的引入使 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX带有正电荷并赋予纳米颗粒一定的亲脂性, 从而更容易被肿瘤细胞内吞. 当 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的浓度为 $10\text{ }\mu\text{g}^{10}\text{B}/\text{mL}$ 时, 平均每个4T1小鼠乳腺癌细胞中 ^{10}B 原子数高达 $(4.92\pm 0.36)\times 10^{11}$ 个. $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX进入4T1细胞后, 主要分布在溶酶体中, 而溶酶体的酸性环境有利于脰键断裂并释放DOX, 从而对细胞产生化疗效应. 结合加速器热中子照射, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX对4T1细胞展现出良好的BNCT/化学联合治疗效果. 因此, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX是一种具有潜在应用价值的多功能纳米硼药.

关键词 碳化硼, 阿霉素, 纳米硼药, 硼中子俘获治疗, 化疗

硼中子俘获治疗(boron neutron capture therapy, BNCT)是一种基于含 ^{10}B 硼药和中子照射的二元靶向肿瘤治疗方法. BNCT治疗肿瘤首先对患者注射硼药, 使之聚集于肿瘤部位, 然后利用热中子或超热中子束对肿瘤部位进行照射, ^{10}B 与中子碰撞发生核裂变反应产生具有高传能线密度的 α 粒子和反冲 ^7Li 从而选择性地杀死肿瘤细胞^[1,2]. 日本已于2020年批准将BNCT用于头颈癌的治疗, 标志着BNCT正式成为临床上治疗肿瘤的手段之一^[3]. BNCT治疗要求肿瘤组织或者细胞中有足够的 ^{10}B , 即每克肿瘤组织中 ^{10}B 含量不少于 $20\text{ }\mu\text{g}$ 或者每个肿瘤细胞内不少于 10^9 个 ^{10}B 原子^[4]. 但是, 目前

临床上使用的两种小分子硼药, 即4-二羟基硼酰基苯丙氨酸(BPA)和巯基十一碳氢十二硼烷钠盐(BSH), 对肿瘤的靶向性都不强, 而且在体内循环时间短, 导致肿瘤中硼含量低. 因此, 亟须研发新型硼药以提高BNCT的疗效. 此外, 最近有报道将BNCT与其他疗法(化疗、光动力疗法等)联用也能有效提高肿瘤治疗效果^[5-7].

无机含硼纳米颗粒包括单质硼、碳化硼和氮化硼等具有 ^{10}B 含量高、生物相容性好和表面修饰容易等优点, 近年来被广泛研究用作BNCT硼递送剂^[8,9]. Kuthala等人^[10]通过球磨法制备了单质 ^{10}B 纳米颗粒, 然后在其表面偶联肿瘤靶向的RGD肽和钆络合物, 实现了磁共

引用格式: 张玉财, 周琪怡, 陈俊阳, 等. 偶联阿霉素 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒的制备及其在联合硼中子俘获治疗/化疗中的应用. 科学通报, 2022, 67: 1546–1554

Zhang Y C, Zhou Q Y, Chen J Y, et al. Doxorubicin-conjugated $^{10}\text{B}_4\text{C}$ nanoparticles: Preparation and application in combined boron neutron capture therapy/chemotherapy (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 1546–1554, doi: 10.1360/TB-2021-0902

振成像(magnetic resonance imaging, MRI)引导下的BNCT治疗小鼠脑胶质瘤。Mortensen等人^[11,12]在 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒表面修饰TAT穿膜肽,使其能够进入B16小鼠恶性黑色素瘤细胞,并通过BNCT高效杀死肿瘤细胞。刘志博课题组^[13]制备了一种可按需生物降解的纳米BN颗粒,用于BNCT治疗小鼠三阴性乳腺癌。在BNCT治疗结束后,对小鼠注射一定剂量的维生素C可使剩余的纳米颗粒快速降解并排出体外,大大提高了纳米硼药的安全性。此外,纳米BN片还可以作为载体装载阿霉素(DOX),而中子照射大大促进了DOX从复合物上释放,实现了肿瘤BNCT/化疗联合治疗^[7]。最近,邢更妹课题组^[14]报道了一种外泌体修饰的含硼荧光碳点,该纳米硼药具有穿越血脑屏障的功能,单次中子照射就对小鼠脑胶质瘤显示出良好的治疗效果,显著延长了荷瘤小鼠的存活率。

用作纳米药物的无机纳米颗粒必须经过合理的表面修饰以增加其在水溶液中的分散性和稳定性。常规的表面修饰方法包括包覆聚乙二醇(PEG)^[15]、吸附蛋白质和多糖等^[16]。我们在前期研究中发现,在无机纳米颗粒表面共价接枝超支化聚丙三醇(PG)不仅能极大地增加无机纳米颗粒的亲水性和分散性^[17],还能有效抑制纳米颗粒被细胞非特异性摄取^[18],增加其在血液中的循环时间,进而借助增强渗透滞留(enhanced permeability and retention, EPR)效应进入肿瘤部位^[19]。更重要的是,PG带有大量的端羟基,其化学可修饰性为纳米颗粒的进一步功能化提供了平台。通过化学反应,本课题组^[20-22]已经在接枝PG的纳米颗粒表面偶联多种功能基团,例如肿瘤靶向肽、荧光标记物和化疗/基因药物等。

本文在 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒表面接枝PG并通过pH敏感的脰键偶联化疗药物阿霉素(DOX),获得了一种新型多功能纳米硼药 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX。表面PG修饰使 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX在水溶液中具有较好的分散性和稳定性;而DOX单元的引入使 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX带有正电荷并赋予纳米颗粒一定的亲脂性,从而更容易被肿瘤细胞内吞。表征了含硼纳米颗粒的物理化学性质,研究了 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的细胞内吞和细胞内分布,及其在肿瘤细胞BNCT/化学联合治疗中的应用。

1 实验

(i) 试剂。 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末(^{10}B 丰度97%)购自Ceradyne公司;天然丰度的 B_4C 粉末(^{10}B 丰度19.6%)购自北京德科岛金科技有限公司。缩水甘油(97%)购自九鼎化学;

二(对硝基苯)碳酸酯(98%)、盐酸阿霉素(DOX·HCl, 98%)、三乙胺(分析纯)购自上海麦克林生化科技有限公司;80%水合肼(分析纯)购自上海凌峰化学试剂有限公司。

(ii) 仪器。纳米颗粒形貌采用FEI公司透射电子显微镜(TEM, FEI TECNAI G20)观察;纳米粒度仪(Malvern Zetasizer, Nano ZS90)测试纳米颗粒的水合粒径和Zeta电位;材料的晶体结构通过Bruker公司的粉末X射线衍射仪(XRD, D8 Advance)测定;紫外-可见吸收光谱利用岛津公司紫外可见近红外分光光度计(UV-3600)测定;荧光光谱在爱丁堡稳态瞬态荧光光谱仪(FLS980)上测定;红外光谱利用Thermo公司傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet iS50)测定;热重分析在NETZSCH公司的同步热分析仪(STA 449 F3 Jupiter)上测定,测试气氛为空气。 ^{10}B 浓度通过Thermo Fisher公司的电感耦合等离子体发射光谱仪(ICAP7200)测定;细胞荧光成像通过Zeiss公司的激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM, LSM 800)观察。

(iii) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG的制备。将1.0 g $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末分散在10 mL超纯水中,加入直径2 mm的玛瑙珠,一起置于50 mL玛瑙球磨罐中,填充度约为50%。然后用行星式球磨机(长沙德科, DECO-PBM-V-0.4L)以500 r/min研磨24 h。获得的 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 分散液以3000 r/min离心10 min,然后收集上清液并冷冻干燥得到 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒。在50 mL圆底烧瓶中加入0.1 g $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒和20 mL缩水甘油,水浴超声分散,然后加热到140℃反应24 h。烧瓶冷却后向其中加入20 mL超纯水,然后超声分散。分散液以3000 r/min离心30 min,然后收集上清液。粗产品用超纯水分散后离心(14000 r/min, 2 h)洗涤3次以除去游离的聚丙三醇。经纯化的 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG分散在超纯水中,在4℃冷藏备用。

(iv) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG- PhNO_2 的制备。取 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG的水分散液(5.0 mg/mL, 20 mL),以14000 r/min离心2 h后弃上清液,沉淀重新超声分散在无水 N,N -二甲基甲酰胺(DMF)中,重复3次。将100 mg二(对硝基苯)碳酸酯和0.1 mL三乙胺加入 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG的DMF分散液中,水浴超声分散,然后室温反应过夜。粗产品用DMF分散后离心(14000 r/min, 2 h)洗涤3次。经纯化的 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG- PhNO_2 分散在DMF中备用。

(v) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-NH-NH₂的制备。向 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG- PhNO_2 的DMF分散液(5.0 mg/mL, 10 mL)中加入0.2 mL 80%

水合肼,然后加热到100°C反应过夜.冷却后粗产品用DMF分散后离心(14000 r/min, 2 h),用水洗涤3次.经纯化的 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-NH-NH₂分散在超纯水中备用.

(vi) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的制备.向 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-NH-NH₂的水分散液(2.0 mg/mL, 10 mL)加入盐酸阿霉素溶液(1.0 mg/mL, 10 mL),继续加入稀NaOH溶液(0.2 mol/L, 40 μL).然后在50°C下避光反应24 h.冷却后粗产品置于超滤管中(100 kDa)离心,然后用超纯水洗涤直至滤液变为无色.经纯化的 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX分散在超纯水中,在4°C下冷藏备用. $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的载药率依照文献[22]的方法计算.

(vii) 细胞培养.4T1小鼠乳腺癌购自ATCC,采用添加10%的胎牛血清和1%的青霉素/链霉素的RPMI-1640培养基,在37°C含5% CO₂的细胞培养箱中培养.

(viii) 细胞内吞实验.将4T1细胞接种在6孔板中(10^5 个/孔),培养24 h后分别加入 ^{10}B 浓度梯度为2.5、5.0和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG和 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX分散液,每组设3个复孔.共孵育24 h后吸出培养基,然后用PBS洗细胞2次以除去游离的纳米颗粒.细胞先用胰酶消化,然后以800 r/min离心收集,再用PBS洗涤2次.使用细胞板计数计算每孔细胞数量,然后加入0.2 mL浓硝酸消解过夜,之后定容至4 mL,通过电感耦合等离子体发射光谱(inductively coupled plasma optical emission spectrometer, ICP-OES)测量样本中 ^{10}B 的浓度.

(ix) 亚细胞共定位实验.4T1细胞接种在玻底培养皿中(10000个/皿),孵育24 h后加入 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX分散液,剂量为0.625 μg $^{10}\text{B}/\text{mL}$,然后共培养24 h.吸出培养基,用PBS洗细胞2次以除去游离的 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX,然后依次加入0.5 mL的Hoechst 33342(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和Lyso-tracker green DND-26(100 nmol/mL),加完分别避光培养20 min,细胞用PBS洗2次后利用激光共聚焦扫描显微镜成像.

(x) 肿瘤细胞BNCT/化学联合治疗.4T1细胞接种于96孔板中(10000个/孔),孵育24 h后加入 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG和 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX分散液, ^{10}B 浓度梯度设为0、1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,之后继续孵育24 h.吸出孔内培养基后,用PBS洗细胞2次以除去游离的纳米颗粒,然后每孔加入300 μL 培养基,再用封板膜(Axygen® Cy-clerSeal)覆盖密封.将96孔板嵌入聚乙烯板中,利用加速器中子源进行热中子照射(2 kW, 1 h, 中子通量为 2.76×10^{11} n/cm²).只用纳米颗粒处理但不照射中子的细胞作为对照.细胞照射后继续孵育2 h,然后用CCK-8

细胞增殖检测试剂盒测试细胞活力.

(xi) 统计学分析.所有统计数据均表示为至少3个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差,组间差异采用Student *t*检验来进行评估,计算采用SPSS统计软件.**P* < 0.05被认为有统计学差异.

2 结果与讨论

2.1 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的制备

$^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的制备如图1所示. $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 经湿法球磨粉碎后,离心取上清得到 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒. $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒表面具有大量的活性含氧官能团,例如C-OH和B-OH,可作为引发缩水甘油开环聚合的活性位点,从而得到 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG.热重分析显示 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG中PG的质量百分比为29.7%(图2(a)). $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG表面的端羟基与二(对硝基苯)碳酸酯在三乙胺的存在下反应生成 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-PhNO₂,进一步用水合肼还原得到 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-NH-NH₂. $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-NH-NH₂与DOX·HCl在弱碱性条件下反应得到目标产物 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX,DOX单元通过胺键连接在纳米颗粒上. $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG分散液呈浅灰色,而 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX分散液变为橘红色,表明DOX偶联成功.紫外-可见吸收光谱测试结合DOX标准曲线计算出 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的载药率为6.9%(质量百分比)[22].由于PG层的亲水性, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX能稳定分散在水中,浓度可达0.12 mg $^{10}\text{B}/\text{mL}$.

2.2 纳米颗粒的理化性质表征

粉末XRD测试结果(图2(b))显示, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末具有斜方六面体晶型(JCPDS #35-0798),19.7°、22.1°、23.5°、31.9°、35.0°和37.8°处的衍射峰分别对应(101)、(003)、(012)、(110)、(104)和(021)晶面[12,23].与 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末相比, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒的衍射峰显著宽化且强度变弱,但位置大致相同,表明球磨仅降低了 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 的尺寸而未改变其晶体结构.

利用TEM观察了不同样品的形貌.如图3所示, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末是尺寸为微米级的颗粒.湿法球磨得到的 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒的形状不规则,尺寸分布较宽(10~150 nm),部分纳米颗粒聚集成团.由于有PG层的空间位阻效应, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG和 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX不易团聚而较均匀地分散在碳膜上,两种纳米颗粒中 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 内核的平均粒径分别为 39.5 ± 20.6 和 41.5 ± 19.5 nm(测量100个纳米颗粒的粒径取平均值).

图 1 (网络版彩色) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的制备流程
Figure 1 (Color online) Preparation process of $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX

图 2 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG在空气中的热失重曲线(a)及 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末和 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒的XRD图谱(b)
Figure 2 Thermogravimetric analysis curve of $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG in the air (a), and XRD spectra of $^{10}\text{B}_4\text{C}$ powder and $^{10}\text{B}_4\text{C}$ nanoparticles (b)

XPS分析了 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末和 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒的表面化学组成(图4)。 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末和 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒表面O/B原子数量比分别为0.74和1.32,表明湿法球磨在 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒表面引入了大量含氧官能团。与 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末相比, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒的B 1s谱(图4(b))在193.4 eV出现了一个峰,揭示其表面存在B—O键^[24]。此外,在 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒表面还检测到了归属于N元素的XPS峰(397.3和402 eV),原因可能是球磨时 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 与空气中的氮气发生了化学反应^[12]。

进一步通过红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)研究了颗粒的表面化学官能团。如图5(a)所示, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末(^{10}B 丰度97%)与天然丰度 B_4C 粉末(^{10}B 丰度19.6%)的红外吸收峰形相近,但是峰的位置

向高波数方向移动了20~40 cm^{-1} ,这是由于 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 中含有更多原子量较小的 ^{10}B 。 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末的红外光谱中,1104和1598 cm^{-1} 处的强吸收峰归属于二十面体结构 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 特征振动^[25]。由于 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒带有大量含氧官能团,其红外光谱与 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末差异大;1140、1434和3300 cm^{-1} 处的吸收峰分别对应 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒表面C—O、B—O和O—H键的伸缩振动。如图5(b)所示, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒接枝PG后,在1030、2890和3300 cm^{-1} 处出现3个强特征吸收峰,分别对应PG上的C—O—C、C—H和O—H伸缩振动。 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-PhNO₂在1787 cm^{-1} 处出现一个新的吸收峰,归属于对硝基苯碳酸酯中的C=O伸缩振动。由于吸电子的对硝基苯基团被给电子的胍基所取代, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-NH-NH₂中C=O峰移动到1705 cm^{-1} 。

图3 TEM图. (a) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末; (b) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒; (c) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG; (d) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX

Figure 3 TEM images. (a) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ powder; (b) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ nanoparticles; (c) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG; (d) $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX

图4 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末与 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒的XPS全谱(a)和B 1s谱(b)

Figure 4 XPS survey spectra (a) and B 1s spectra (b) of $^{10}\text{B}_4\text{C}$ powder and $^{10}\text{B}_4\text{C}$ nanoparticles

图5 B_4C 粉末、 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 粉末和 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒(a)以及 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG、 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG- PhNO_2 、 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG- NH-NH_2 和 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX(b)的红外光谱

Figure 5 FTIR spectra of B_4C powder, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ powder, and $^{10}\text{B}_4\text{C}$ nanoparticles (a) and $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG- PhNO_2 , $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG- NH-NH_2 , and $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX (b)

$^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的谱图中1727和1580 cm^{-1} 处的吸收峰分别对应DOX中的C=O伸缩振动和芳环骨架伸缩振动^[22]。

如表1所示, 动态光散射(dynamic light scattering, DLS)测得 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒在纯水中的水合粒径为 119.5 ± 39.7 nm; PDI为0.112, 显示没有形成大的团聚。由于 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG的制备过程中, 一部分粒径较大的颗粒通过离心沉淀除去, 因此 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG的水合粒径(111.1 ± 33.4 nm)和PDI(0.091)比 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒略小。而 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的水合粒径进一步减小为 90.4 ± 28.1 nm, 这可能是由于表面疏水性的DOX单元降低了 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX中PG层在水中的伸展度。我们通过测量Zeta电位分析了纳米颗粒的表面电荷。由于 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒表面大量的硼酸基团电离使其带有负电荷(Zeta电位= -38.0 ± 9.5 mV)^[12]。而因为一部分硼酸基团作为活性位点接枝PG转化为硼酸酯基团, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG的Zeta电位上升到 -19.7 ± 7.8 mV。 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的Zeta电位急剧上升到 28.4 ± 8.7 mV, 主要是因为DOX单元上的氨基与水中的

表 1 不同纳米颗粒的DLS和Zeta电位测试结果

Table 1 DLS and Zeta potential data of different nanoparticles

样品	水合粒径(nm)	多分散系数(PDI)	Zeta电位(mV)
$^{10}\text{B}_4\text{C}$ 纳米颗粒	119.5±39.7	0.112	-38.0±9.5
$^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG	111.1±33.4	0.091	-19.7±7.8
$^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX	90.4±28.1	0.123	28.4±8.7

H^+ 结合而形成带正电的 NH_3^+ [26]。

纳米颗粒的光学性质用紫外-可见吸收(ultraviolet-visible, UV-Vis)光谱和荧光(photoluminescence, PL)光谱表征。如图6所示, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG没有明显的吸收带, 而 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX在480 nm处出现了归属于DOX单元的特征吸收带。此外, 由于DOX单元还具有发射荧光的特性, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX在595 nm检测到一个较强的荧光发射峰, 峰形和位置与DOX·HCl相同。

2.3 纳米颗粒的细胞内吞与亚细胞共定位

为了研究肿瘤细胞对纳米颗粒的摄取, 我们用不同浓度梯度的 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG和 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX与4T1小鼠乳腺癌细胞共培养, 利用ICP-OES测量细胞中 ^{10}B 含量, 然后计算每个细胞中 ^{10}B 原子数。如表2所示, 即使当 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG浓度为 $10 \mu\text{g } ^{10}\text{B/mL}$ 时, 平均每个细胞中 ^{10}B 原子数也仅有 $(2.25\pm0.32)\times10^9$ 个。这是因为 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG表面带有大量负电荷, 静电斥力阻碍其与同样带有负电荷的细胞膜之间相互接触。此外, 超支化PG层能有效降低纳米颗粒吸附蛋白形成蛋白冠, 从而抑制其被4T1细胞内吞[18]。与之相对的是, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX表面带有正电荷, 能通过静电引力吸附到细胞膜上; 同时, DOX的蒽环结构具有亲脂性, 使 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX易于穿

表 2 用 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG或 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX处理后的单个4T1细胞中 ^{10}B 原子数($n=3$)

Table 2 The number of ^{10}B atoms in each 4T1 cell treated with $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG or $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX ($n=3$)

纳米颗粒浓度 ($\mu\text{g } ^{10}\text{B/mL}$)	单个细胞中 ^{10}B 原子数	
	$^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG组	$^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX组
2.5	n.d. ^{a)}	$(7.92\pm0.8)\times10^{10}$
5.0	n.d. ^{a)}	$(2.07\pm0.25)\times10^{11}$
10	$(2.25\pm0.32)\times10^9$	$(4.92\pm0.36)\times10^{11}$

a) n.d.: 未检出

透细胞膜进入细胞内[26]。因此, 每个细胞中 ^{10}B 原子数随 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX浓度的升高而增加。当 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX浓度为 $10 \mu\text{g } ^{10}\text{B/mL}$ 时, 平均每个4T1细胞中 ^{10}B 原子数高达 $(4.92\pm0.36)\times10^{11}$ 个, 为开展肿瘤细胞BNCT治疗提供了有利条件。

借助 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的荧光特性, 通过激光共聚焦扫描显微镜进一步研究了其在细胞内的分布。如图7所示, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX的红色荧光与溶酶体探针Lysotracker green的绿色荧光重合得很好, 说明 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX进入4T1细胞后主要分布在溶酶体中。由于 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX中连接 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG与DOX单元的腙键在酸性条件下容易断裂, 而细胞溶酶体具有弱酸环境($\text{pH} \approx 5.0$), 因此有利于DOX从纳米颗粒表面释放而产生化疗效应[22]。

2.4 肿瘤细胞BNCT/化学联合治疗

散裂中子源科学中心的加速器中子源为细胞BNCT实验提供热中子照射, 中子通量为 $2.76\times10^{11} \text{ n/cm}^2$ 。为了研究纳米颗粒对肿瘤细胞的杀伤效应, 我们将不同浓度的 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG和 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX分别与4T1细胞共培

图 6 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG、 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX和DOX·HCl的紫外-可见吸收光谱(a)以及 $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX和DOX·HCl的荧光光谱(b)

Figure 6 UV-Vis absorption spectra of $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG, $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX, and DOX·HCl (a) and PL spectra of $^{10}\text{B}_4\text{C}$ -PG-DOX and DOX·HCl (b)

图7 (网络版彩色) $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$ 处理4T1细胞的CLSM图像
Figure 7 (Color online) CLSM images of 4T1 cells treated with $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$

图8 纳米颗粒处理的4T1细胞在有热中子照射时的细胞活力($n=3$). (a) 用 $^{10}\text{B}_4\text{C-PG}$ 处理; (b) 用 $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$ 处理
Figure 8 Cell viability of nanoparticle-treated 4T1 cells with or without neutron irradiation ($n=3$). (a) $^{10}\text{B}_4\text{C-PG}$ treated; (b) $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$ treated

养, 然后用CCK-8检测在有中子照射情况下的细胞活力. 如图8(a)所示, 无论是否照射热中子, $^{10}\text{B}_4\text{C-PG}$ 均未对4T1细胞产生明显的杀伤效应. 虽然在高 $^{10}\text{B}_4\text{C-PG}$ 浓度时($\geq 10 \mu\text{g } ^{10}\text{B/mL}$)每个细胞中的 ^{10}B 原子数超过 10^9 个, 但是由于照射的中子通量较低而不能通过中子俘获反应产生足够的 α 粒子破坏肿瘤细胞. 相反, 由于 $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$ 本身具有化疗效应, 在无热中子照射时即表现出一定的细胞杀伤效应, 半抑制浓度(IC_{50})为 $8.8 \mu\text{g } ^{10}\text{B/mL}$. 当有热中子照射时, $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$ 对4T1细胞的杀伤效应明显增强($P=0.012$), IC_{50} 下降为 $3.2 \mu\text{g } ^{10}\text{B/mL}$ (图8(b)). 以上结果说明 $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$ 具有BNCT/化学联合治疗作用, 后续将进一步研究两种

疗法的协同机制, 并开展体内治疗实验.

3 结论

综上所述, 本研究通过表面化学修饰制备了一种胺键偶联DOX的新型纳米硼药 $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$. $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$ 在水溶液中具有良好的分散性和稳定性, 而且容易被4T1细胞内吞, 每个细胞内的 ^{10}B 原子数达到BNCT治疗要求. $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$ 进入细胞后主要分布在溶酶体中, 其酸性环境有利于DOX的释放而产生化疗效应. 结合热中子照射, $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$ 对4T1细胞展现出良好的BNCT/化学联合治疗效果. 因此, $^{10}\text{B}_4\text{C-PG-DOX}$ 是一种具有潜在应用价值的多功能纳米硼药.

致谢 感谢中国科学院高能物理研究所李娟博士在细胞BNCT实验中的帮助.

参考文献

- 1 Barth R F, Grecula J C. Boron neutron capture therapy at the crossroads—Where do we go from here? Appl Radiat Isot, 2020, 160: 109029

- 2 Barth R F, Coderre J A, Vicente M G H, et al. Boron neutron capture therapy of cancer: Current status and future prospects. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 3987–4002
- 3 Xu D, Zhang Y C, Zhou Q Y, et al. Boron neutron capture therapy of cancers: Principles and recent research progress (in Chinese). *Chin J Radiol Med Prot*, 2021, 41: 74–77 [徐笛, 张玉财, 周琪怡, 等. 肿瘤硼中子俘获治疗的理论基础与近期研究进展. *中华放射医学与防护杂志*, 2021, 41: 74–77]
- 4 Barth R F, Mi P, Yang W. Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer. *Cancer Commun*, 2018, 38: 35
- 5 Hao E, Friso E, Miotto G, et al. Synthesis and biological investigations of tetrakis(*p*-carboranylthio-tetrafluorophenyl)chlorin (TPFC). *Org Biomol Chem*, 2008, 6: 3732–3740
- 6 Hiramatsu R, Kawabata S, Tanaka H, et al. Tetrakis(*p*-carboranylthio-tetrafluorophenyl)chlorin (TPFC): Application for photodynamic therapy and boron neutron capture therapy. *J Pharm Sci*, 2015, 104: 962–970
- 7 Li L, Dai K, Li J, et al. A boron-10 nitride nanosheet for combinational boron neutron capture therapy and chemotherapy of tumor. *Biomaterials*, 2021, 268: 120587
- 8 Hu K, Yang Z, Zhang L, et al. Boron agents for neutron capture therapy. *Coord Chem Rev*, 2020, 405: 213139
- 9 Li J Y, Tu Z Y, Liu Z B. Development history of boron delivery agents (in Chinese). *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 1296–1319 [李纪元, 涂智宇, 刘志博. 走进曙色的冷门方向: 硼携带剂发展历程简述. *中国科学: 化学*, 2020, 50: 1296–1319]
- 10 Kuthala N, Vankayala R, Li Y N, et al. Engineering novel targeted boron-10-enriched theranostic nanomedicine to combat against murine brain tumors via MR imaging-guided boron neutron capture therapy. *Adv Mater*, 2017, 29: 1700850
- 11 Mortensen M W, Björkdahl O, Sørensen P G, et al. Functionalization and cellular uptake of boron carbide nanoparticles. The first step toward T cell-guided boron neutron capture therapy. *Bioconjugate Chem*, 2006, 17: 284–290
- 12 Mortensen M W, Sørensen P G, Björkdahl O, et al. Preparation and characterization of boron carbide nanoparticles for use as a novel agent in T cell-guided boron neutron capture therapy. *Appl Radiat Isot*, 2006, 64: 315–324
- 13 Li L, Li J, Shi Y, et al. On-demand biodegradable boron nitride nanoparticles for treating triple negative breast cancer with boron neutron capture therapy. *ACS Nano*, 2019, 13: 13843–13852
- 14 Li J, Kong J, Ma S, et al. Exosome-coated ¹⁰B carbon dots for precise boron neutron capture therapy in a mouse model of glioma *in situ*. *Adv Funct Mater*, 2021, 31: 2100969
- 15 Karakoti A S, Das S, Thevuthasan S, et al. PEGylated inorganic nanoparticles. *Angew Chem Int Edit*, 2011, 50: 1980–1994
- 16 Moore T L, Rodriguez-Lorenzo L, Hirsch V, et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 6287–6305
- 17 Zhao L, Takimoto T, Ito M, et al. Chromatographic separation of highly soluble diamond nanoparticles prepared by polyglycerol grafting. *Angew Chem Int Edit*, 2011, 50: 1388–1392
- 18 Zou Y, Ito S, Yoshino F, et al. Polyglycerol grafting shields nanoparticles from protein corona formation to avoid macrophage uptake. *ACS Nano*, 2020, 14: 7216–7226
- 19 Yoshino F, Amano T, Zou Y, et al. Preferential tumor accumulation of polyglycerol functionalized nanodiamond conjugated with cyanine dye leading to near-infrared fluorescence *in vivo* tumor imaging. *Small*, 2019, 15: 1901930
- 20 Zhao L, Chano T, Morikawa S, et al. Hyperbranched polyglycerol-grafted superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization, functionalization, size separation, magnetic properties, and biological applications. *Adv Funct Mater*, 2012, 22: 5107–5117
- 21 Zhao L, Xu Y H, Qin H, et al. Platinum on nanodiamond: A promising prodrug conjugated with stealth polyglycerol, targeting peptide and acid-responsive antitumor drug. *Adv Funct Mater*, 2014, 24: 5348–5357
- 22 Zhao L, Xu Y H, Akasaka T, et al. Polyglycerol-coated nanodiamond as a macrophage-evading platform for selective drug delivery in cancer cells. *Biomaterials*, 2014, 35: 5393–5406
- 23 Kirihaara K, Mukaida M, Shimizu Y. Electrical transport and thermoelectric properties of boron carbide nanowires. *Nanotechnology*, 2017, 28: 145404
- 24 Song N, Gao Z, Li X. Tailoring nanocomposite interfaces with graphene to achieve high strength and toughness. *Sci Adv*, 2020, 6: eaba7016
- 25 Li X, Jiang D, Zhang J, et al. The dispersion of boron carbide powder in aqueous media. *J Eur Ceram Soc*, 2013, 33: 1655–1663
- 26 Li D, Zhang Y, Xu J, et al. Surface-engineered carbon nanohorns as a theranostic nanodevice for photoacoustic imaging and effective radiochemotherapy of cancer. *Curr Alzheimer Res*, 2021, 180: 185–196

Summary for “偶联阿霉素¹⁰B₄C纳米颗粒的制备及其在联合硼中子俘获治疗/化疗中的应用”

Doxorubicin-conjugated ¹⁰B₄C nanoparticles: Preparation and application in combined boron neutron capture therapy/chemotherapy

Yucui Zhang¹, Qiyi Zhou¹, Junyang Chen^{2,3}, Jianfei Tong^{2,3}, Tianjiao Liang^{2,3} & Li Zhao^{1*}¹ Collaborative Innovation Center of Radiation Medicine of Jiangsu Higher Education Institutions, State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, School of Radiation Medicine and Protection, Soochow University, Suzhou 215123, China;² Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;³ Spallation Neutron Source Science Center, Dongguan 523803, China* Corresponding author, E-mail: lizhao@suda.edu.cn

Boron neutron capture therapy (BNCT), which is capable of killing cancer cells precisely with α particles and recoiling ⁷Li nuclei produced by the nuclear fission reaction of thermal neutrons and ¹⁰B in the cells, has attracted tremendous attention in recent years. Delivering sufficient ¹⁰B into the cancer cells ($> 10^9$ /cell) is crucial to successful BNCT. Although considerable effort has been devoted to develop cancer-targeted ¹⁰B delivery agents, currently only two boron-containing compounds, i.e., borylphenylalanine (BPA) and sodium mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate (BSH) are clinically used in BNCT. On the other hand, combining BNCT with other cancer treatments such as chemotherapy, photodynamic therapy, and immunotherapy can enhance the therapeutic efficacy. Thus, it is highly desired to develop multifunctional ¹⁰B delivery agents that enable combination cancer therapy.

Boron-containing inorganic nanoparticles such as ¹⁰B, ¹⁰B₄C, and ¹⁰BN nanoparticles, containing a large number of boron atoms in a single nanoparticle are promising candidates as ¹⁰B delivery agents for BNCT. In addition, these nanoparticles possess low toxicity and good biocompatibility, and are rich in surface chemistry that facilitates further tailoring. For biomedical applications of inorganic nanoparticles, surface modification is essential to increase their aqueous dispersibility and colloidal stability. We have recently developed polyglycerol (PG) grafting as a convenient and effective method for surface modification of inorganic nanoparticles. The PG layer of hyperbranched topology contains many hydroxyl groups on the periphery, which not only largely increase the hydrophilicity of the nanoparticles, but also provide reactive groups for further functionalization through chemical reactions. Through this approach, a wide range of functional moieties including targeting ligands, fluorescent tags, and therapeutic drugs and DNAs have been immobilized on the surface of nanoparticles.

Herein, we developed DOX-conjugated ¹⁰B₄C nanoparticles (¹⁰B₄C-PG-DOX) for combined BNCT/chemotherapy. ¹⁰B₄C nanoparticles prepared by wet ball milling of ¹⁰B₄C powder possessed many oxygen-containing groups (e.g., B-OH and C-OH) on the surface, which were used as starting points to graft PG through ring-opening polymerization of glycidol. The obtained ¹⁰B₄C-PG was surface engineered to conjugate DOX through pH-sensitive hydrazone bond, yielding ¹⁰B₄C-PG-DOX. The PG layer provides ¹⁰B₄C-PG-DOX with sufficient dispersibility and stability in aqueous media. On the other hand, the conjugated DOX endows the nanoparticles with positive charge and lipophilicity that facilitate cell uptake. When the concentration of ¹⁰B₄C-PG-DOX is 10 μ g ¹⁰B/mL, the number of ¹⁰B atoms in a single treated 4T1 murine breast cancer cell can reach as high as $(4.92 \pm 0.36) \times 10^{11}$. Following the cell internalization, ¹⁰B₄C-PG-DOX nanoparticles are mainly distributed in the lysosomes of 4T1 cells, where the mild acidic environment is capable of cleaving the hydrazone bond to release chemotherapeutic DOX. Upon exposure to thermal neutrons generated by an accelerator, ¹⁰B₄C-PG-DOX exerted excellent therapeutic efficacy of combined BNCT/chemotherapy towards 4T1 cells.

In conclusion, multifunctional ¹⁰B₄C-PG-DOX was fabricated by rational surface engineering of ¹⁰B₄C nanoparticles, showing a great promise in combined BNCT/chemotherapy of cancer. Future work will focus on *in vivo* studies of ¹⁰B₄C-PG-DOX, including pharmacokinetics and combination therapy on mouse tumor models.

boron carbide, doxorubicin, boron nanomedicine, boron neutron capture therapy, chemotherapy

doi: [10.1360/TB-2021-0902](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0902)