

水溶性 IR-780 聚合物用于线粒体靶向的光动力治疗*

李嫣然^{a,c} 王子贵^{b,c} 汤朝晖^{*,a,c}

(^a 中国科学院长春应用化学研究所 中国科学院生态环境高分子材料重点实验室 长春 130022)

(^b 中国科学院长春应用化学研究所 高分子物理与化学重点实验室 长春 130022)

(^c 中国科学技术大学 应用化学与工程学院 合肥 230026)

摘要 11-氯-1,1'-二正丙基-3,3,3',3'-四甲基-10,12-三甲苯基吡啶三碳花青碘盐(IR-780)被具有较强组织穿透能力的近红外光照射后,能快速高效地产生活性氧,导致细胞死亡,可用于光动力治疗。但是 IR-780 的水溶性差,这极大地限制了其生物学应用。基于此我们设计合成了可高效靶向线粒体的水溶性 IR-780 聚合物 Poly-IR, Poly-IR 在水中自组装成为纳米粒子。Poly-IR 纳米粒子受近红外光激活后,在肿瘤细胞内外均能快速高效地产生活性氧,并且该纳米粒子能够在线粒体中富集,受近红外光的激发后产生的活性氧能够破坏线粒体,导致线粒体膜电位降低。细胞毒性、活死细胞染色及凋亡实验结果也进一步证明,该纳米粒子在近红外光照下能够有效地抑制肿瘤细胞的增殖。本体系为靶向线粒体的光动力治疗肿瘤领域拓展了思路。

关键词 光动力疗法; 活性氧; IR-780; 线粒体靶向; 纳米粒子

Water Soluble IR-780 Polymer for Mitochondria-Targeted Photodynamic Therapy*

Li, Yanran^{a,c} Wang, Zigui^{b,c} Tang, Zhaohui^{*,a,c}

(^a Key Laboratory of Polymer Ecomaterials, Chinese Academy of Sciences, Changchun Institute of Applied Chemistry of Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

(^b State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry of Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

(^c College of Applied Chemistry and Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract 11-Chloro-1,1'-di-*n*-propyl-3,3,3',3'-tetramethyl-10,12-trimethyleneindatricarbocyanine iodide (IR-780) is a near infrared (NIR) photosensitizer for cancer treatment. Under NIR irradiation, IR-780 efficiently generates singlet oxygen or other reactive oxygen species (ROS) in lesion position that ultimately cause cell apoptosis and necrosis. However, biomedical application of IR-780 was limited by its poor water solubility. In this work, we designed a water-soluble IR-780 polymer (Poly-IR) for mitochondria-targeted photodynamic therapy via condensation polymerization. The results of dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscope (TEM) displayed that Poly-IR was self-assembled into nanoparticles in water. And ROS detection experiments demonstrated that Poly-IR quickly and efficiently generated ROS under NIR irradiation in solution and cells. The cellular distribution of the Poly-IR was monitored by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Colocalization experiments with mitochondrial stain revealed a high degree of colocalization between Poly-IR and mitochondria, which illustrated that Poly-IR selectively accumulated in mitochondria. Furthermore, we explored the photo-damages of Poly-IR to mitochondria through monitoring the change of mitochondrial membrane potential that was stained by JC-1 probe. In the dark, red fluorescence emerged with Poly-IR treated A549 cells. Under NIR irradiation, the red fluorescence was disappeared and green fluorescence was generated in Poly-IR treated cells, which confirmed the photodamage of Poly-IR to mitochondria. The cytotoxicity of Poly-IR was measured by MTT assay (MTT=3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). The IC₅₀ values of Poly-IR for A549 cells and MCF-7 cells were 9.13 and 10.98 μg/mL respectively in the dark. At the same time, the IC₅₀ values of Poly-IR for A549 cells and MCF-7 cells were 4.57 and 0.22 μg/mL respectively under NIR irradiation. The cytotoxicity of Poly-IR for MCF-7 cells treated with NIR exposure was significantly increased 50 times compared to without irradiation. Live/dead cell staining experiments also verified that Poly-IR had more phototoxicity. Meanwhile, cytotoxicity on tumor cells was also detected by flow cytometry apoptosis assay according to the typical Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (PI) double staining principle. These results suggested that Poly-IR promoted tumor cells apoptosis under near-IR irradiation, which expanded ideas in mi-

*Dedicated to the 10th anniversary of the Youth Innovation Promotion Association, CAS.

* E-mail: ztang@ciac.ac.cn

Received December 3, 2021; published January 7, 2022.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 52025035, 51873206).

* 庆祝中国科学院青年创新促进会十年华诞。

国家自然科学基金(Nos. 52025035, 51873206)资助项目。

tochondria-targeted photodynamic therapy in cancer treatment.

Keywords photodynamic therapy; reactive oxygen species (ROS); IR-780; mitochondria-target; nanoparticles

1 引言

光动力疗法具有较低的系统毒性、病灶可选择性及非侵入性治疗等优点,是一种极具前景的癌症治疗策略^[1-3].其作用机理是光敏剂受到光的激发后,基态的电子跃迁至激发态,激发态的光敏剂将能量或者电子转移给周围的氧气,产生超氧自由基阴离子、过氧化物、羟基自由基或单线态氧等活性氧(ROS)^[4-5].活性氧具有极强的氧化性^[6],会对肿瘤微血管造成不可逆损伤,并与很多生物活性大分子发生氧化还原反应,如核酸碱基及氧化胆固醇,进而抑制肿瘤增殖^[7-9].由于多数光敏剂的水溶性及激发光的组织穿透深度非常有限^[10-12],仅适用于治疗表层肿瘤,因此提高光敏剂的水分散性及增加激发光波长极其重要.

在生理条件下,活性氧的寿命很短,半衰期为0.03~0.18 ms,因此活性氧产生的位置直接影响光动力的治疗效果.相较于没有靶向的光动力疗法,细胞器靶向的光动力疗法能破坏细胞的重要部分,可以有效杀伤肿瘤细胞^[13].在众多细胞器中,线粒体广泛分布于细胞质中,具有磷脂双分子层结构,在细胞呼吸及凋亡中扮演重要作用^[14-17],与细胞的凋亡息息相关,因此线粒体是光动力治疗的理想靶点.靶向线粒体的光敏剂经光活化后所产生的活性氧能快速破坏线粒体的生物学功能,进而导致肿瘤细胞的凋亡^[18-19].由于线粒体内膜带负电,因此带正电的化合物在进入细胞后易于聚集在线粒体中.通常在光敏剂上修饰带正电的基团,例如,三苯基磷或亲脂性阳离子等,用于线粒体靶向. IR-780 是一种近红外光敏剂,可被具有较强组织穿透能力的近红外光激活,受到近红外光照射时,可产生大量的活性氧,并且相较于目前多数线粒体靶向的光动力疗法工作中在光敏剂上修饰靶向基团, IR-780 本身就具有靶向线粒体的能力^[20].但是 IR-780 水溶性差,这极大限制了其在生物医学上的应用^[21].

基于上述原因,本文设计了可高效靶向线粒体的主链含有 IR-780 的水溶性聚合物 Poly-IR. 该聚合物可在水中自组装成纳米粒子,并且在细胞内外均能快速高效地产生活性氧.同时,该纳米药物在多种肿瘤细胞系中都能够高效富集到线粒体中,当被 808 nm 的近红外光照射后产生的 ROS 将会破坏线粒体,导致线粒体膜电位的下降.细胞毒性、活死细胞染色及细胞凋亡实验的结果表明,该纳米药物能导致肿瘤细胞的凋亡,进一步证明 Poly-IR 用于光动力治疗的可行性(图 1).相较于多数线粒体靶向的光动力疗法中在光敏剂上修饰靶向基团,本工作将本身具有线粒体靶向的 IR-780 作为光敏剂,从而避免了多步的化学合成.并将 IR-780 作为单体通过缩聚反应键合在高分子主链上,不仅避免了再次合

成递送载体,并且解决了 IR-780 的水溶性问题.

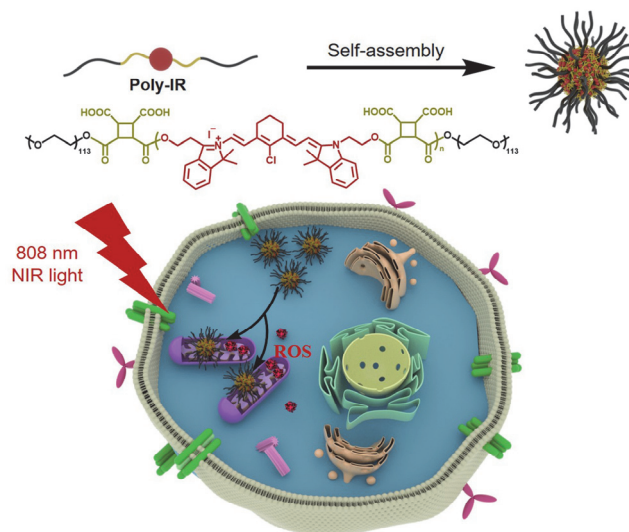


图 1 Poly-IR 靶向线粒体治疗示意图

Figure 1 Schematic of mitochondria-targeted treatment of Poly-IR

2 结果与讨论

2.1 Poly-IR 纳米粒的制备及表征

在这项工作中,选择环丁四烷甲酸二酐及带有双羟基并本身具有线粒体靶向的 IR-780-OH₂ 作为聚合单体,通过缩聚反应制备了两端带有酸酐的缩聚物,为提高缩聚物的水溶性,再在两端键合分子量 5000 的 mPEG-OH.

按照图 2A 所示的路线合成 Poly-IR,首先按照文献方法合成了双羟基的 IR-780 (IR-780-OH₂) (支持信息,图 S1)^[27],其核磁氢谱(支持信息,图 S2)及质谱数据与文献相符,说明 IR-780-OH₂ 的成功合成.随后 IR-780-OH₂ 与 1,2,3,4-环丁四烷甲酸二酐(CBDA)缩聚得到 Co-Poly,再用 mPEG-OH (*M_w*=5000)进行封端,通过透析和冻干得到 Poly-IR.首先测定了 Co-Poly 的核磁氢谱(支持信息,图 S3),发现原来 IR-780-OH₂ 的 7 号位置上亚甲基(-O-CH₂-CH₂-)的化学位移由 δ 4.06 变为 δ 5.05,并在 δ 12.63 处出现了羧基峰,这些提示酯键和羧基的形成,由此说明 Co-Poly 的成功合成.通过 9 号位置(-CH=CH-)与 12 号位置(-CH-)的积分面积比计算得到 Co-Poly 的聚合度是 10.随后,对 Poly-IR 的核磁氢谱的峰进行归属,发现在 δ 3.51 处出现了 mPEG-OH 中亚甲基(-O-CH₂CH₂-)的峰.当共聚物的两端接上 mPEG-OH 时,由共聚物的聚合度可以计算理论上 mPEG-OH 中亚甲基与 9 号位置次甲基的积分面积比是 45,而实际得到的积分面积比也是 45,与理论计算结果相符,这说明

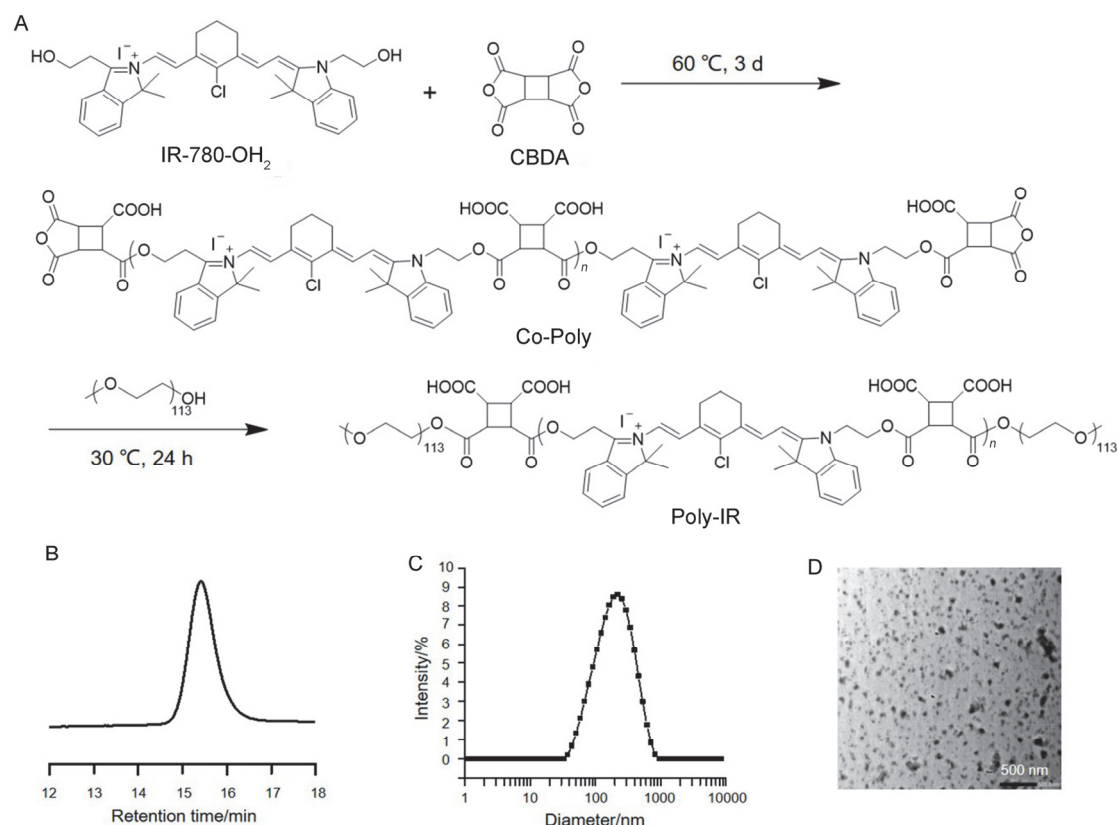


图2 (A) Poly-IR 的合成路线; (B) Poly-IR 的 GPC 曲线; (C) Poly-IR 的 DLS 曲线; (D) Poly-IR 的透射电镜图

Figure 2 (A) Synthetic route of Poly-IR; (B) GPC curve of Poly-IR; (C) DLS curve of Poly-IR; (D) transmission electron microscope (TEM) image of Poly-IR

Poly-IR 两端键合了 mPEG-OH (支持信息, 图 S4). 由凝胶渗透色谱(GPC)测定 Poly-IR 的 $M_n = 17.0 \times 10^3$, PDI 为 1.05, 并为单峰分布(图 2B). 上述实验结果说明 Poly-IR 被成功合成. 通过动态光散射(DLS)测定流体动力学直径是 170 nm, 分散度(PDI)为 0.261 (图 2C). 通过透射电镜(TEM)测得粒径为 110 nm (图 2D). 由此说明 Poly-IR 可在水中自组装成纳米粒. 通过紫外 Poly-IR 的最大吸收峰在 750 nm, 最大发射峰在 808 nm (支持信息, 图 S5).

2.2 Poly-IR 纳米粒的活性氧检测

1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)是常用的 ROS 检测剂^[22], 它在 420 nm 处的紫外吸收会随着 ROS 的产生而减少, 我们用 DPBF 检测 Poly-IR 产生 ROS 的能力. 发现光照对 DPBF 纯溶液在 420 nm 处的特征吸收峰基本无影响(图 3A), 说明 808 nm, 0.9 W/cm² 的光照不会产生 ROS. 当 DPBF 与 Poly-IR 形成混合溶液后, 在光照条件下, 随时间增加, 在 780 nm 处的吸收峰只有稍稍降低, 而在 420 nm 处的吸收峰急剧降低, 这说明 Poly-IR 可以高效快速地产生 ROS (图 3B). 另外, 通过 DPBF 溶液与 DPBF 及 Poly-IR 的混合溶液的紫外吸收下降速率的对比可以看出光照可以有效使 Poly-IR 产生活性氧, 并计算得到 Poly-IR 的单线态氧产率为 0.21(图 3C).

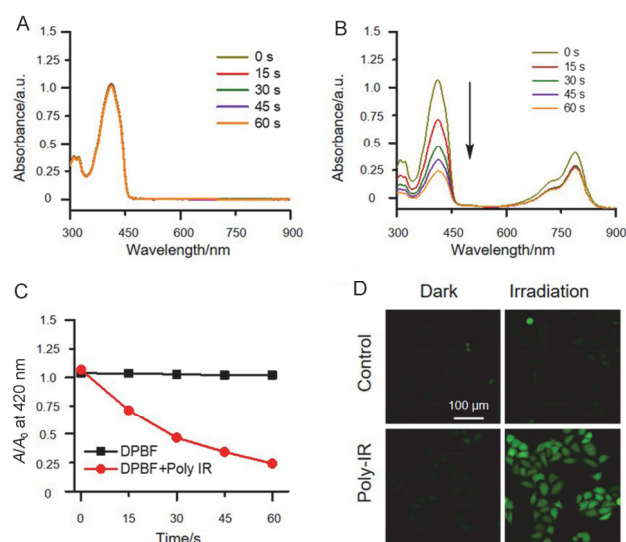


图3 (A) DPBF 在 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中光照时的紫外吸收光谱; (B) Poly-IR 与 DPBF 在 DMF 中光照时的紫外吸收光谱; (C) 光照时, DPBF 及 DPBF 与 Poly-IR 在 420 nm 处的吸光度变化; (D) Poly-IR 在 A549 细胞内产生 ROS 的情况(光照参数: 808 nm, 0.9 W/cm², 1 min)

Figure 3 (A) UV absorption spectra of DPBF in *N,N*-dimethylformamide (DMF) under irradiation; (B) UV absorption spectra of DPBF and Poly-IR in DMF under irradiation; (C) absorbance change at 420 nm for DPBF, DPBF and Poly-IR under irradiation; (D) CLSM images of intracellular ROS generation in A549 cells (irradiation parameters: 808 nm, 0.9 W/cm², 1 min)

进一步,我们用荧光探针 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)在细胞水平上检测了 Poly-IR 产生活性氧的能力. DCFH-DA 本身没有荧光,进入细胞内后,可以被细胞内的酯酶水解生成有荧光的 2',7'-二氯荧光素(DCFH),而 DCFH 不能通透细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内,因此,检测 DCFH 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平^[23]. 当 A549 细胞只摄取 DCFH-DA 时,由于细胞中本身存在氧化还原平衡,细胞内少量的 ROS 与 DCF-DA 结合后,无论光照与否,都有微弱的绿色荧光产生. 当 A549 细胞同时摄取 Poly-IR 及 DCF-DA 后,在黑暗条件下,细胞中有微弱荧光信号,这是由于 DCF-DA 结合了细胞中少量的 ROS,而在近红外光条件下,细胞中有很强的荧光信号. 这说明 Poly-IR 被光照后,在细胞中确实能产生大量的 ROS (图 3D), Poly-IR 具有光动力治疗的潜力.

2.3 Poly-IR 靶向线粒体

我们利用激光共聚焦显微镜探究了 Poly-IR 在 A549、A2780 及 MCF-7 细胞中的分布. 用线粒体绿色荧光探针标记了肿瘤细胞中的线粒体^[24]. 在黑暗条件下, A549、A2780 及 MCF-7 细胞孵育 Poly-IR 4 h 后, Poly-IR 的红色荧光与线粒体中的绿色荧光高度重合,重合指数分别为 0.95、0.96 及 0.91,由此说明 Poly-IR 可有效富集在线粒体中(图 4A).

线粒体在细胞代谢和凋亡中发挥着重要作用,靶向线粒体的光动力疗法在光照时产生的 ROS,会破坏线粒体的生物学功能,进而导致肿瘤细胞的凋亡^[25]. 由于线粒体膜电位的下降是细胞凋亡的一个标志,因此我们探究了 Poly-IR 被光照后产生的 ROS 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响. 利用线粒体膜电位检测探针 JC-1 进行检测,当 A549 细胞只孵育 JC-1 探针时, JC-1 探针在线粒体形成聚集体,产生红色荧光信号,说明细胞线粒体膜电位正常. 当 Poly-IR 在黑暗条件下与 JC-1 探针共孵育时,红色荧光信号基本无变化,说明 Poly-IR 在无

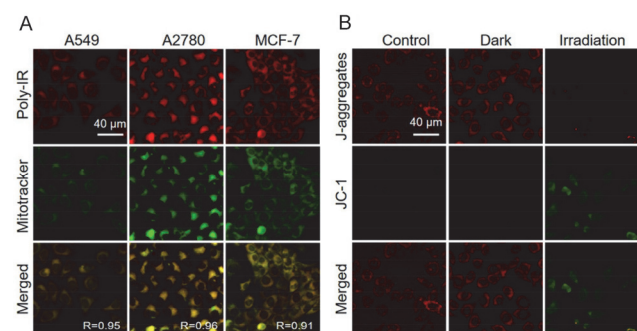


图 4 (A) Poly-IR 在 A549、A2780 及 MCF-7 细胞系中的线粒体共定位的激光共聚焦图片; (B) Poly-IR 对 A549 细胞的线粒体膜电位影响的激光共聚焦图片(光照参数: 808 nm, 0.9 W/cm², 1 min)
Figure 4 (A) CLSM images of Poly-IR located in mitochondria of A549, A2780 and MCF-7 cells; (B) CLSM images of effects of Poly-IR on mitochondrial membrane potential of A549 cell (irradiation parameters: 808 nm, 0.9 W/cm², 1 min)

光照时,对线粒体膜电位无影响;但当 Poly-IR 经光照处理后与 JC-1 探针共孵育时,红色荧光信号消失,并产生了绿色荧光,表明线粒体膜电位降低, JC-1 探针在线粒体中以单体形式存在,提示线粒体膜被破坏, Poly-IR 有光毒性(图 4B).

2.4 Poly-IR 的细胞毒性

随后,我们考察了 Poly-IR 对 A549 及 MCF-7 细胞增殖的抑制效果. 在黑暗条件下, Poly-IR 在 A549 及 MCF-7 细胞中的 IC₅₀ 值分别是 9.13 和 10.98 μg/mL,说明 Poly-IR 在黑暗条件下对两种细胞增殖的抑制效果相当(图 5A). 当 A549 细胞孵育 Poly-IR 并用近红外光激发, IC₅₀ 值变为 4.57 μg/mL. 当 MCF-7 细胞孵育 Poly-IR 并用近红外光激发, IC₅₀ 值变为 0.22 μg/mL,相较于黑暗组,毒性增加了 50 倍. 由活死细胞染色实验进一步证明, Poly-IR 的光毒性能快速导致肿瘤细胞的死亡(图 5B). 进一步,我们用流式细胞仪来验证 Poly-IR 诱导肿瘤细胞发生凋亡的能力. 利用细胞凋亡检测试剂盒,进行了 Annexin V-FITC/PI 染色分析^[26]. 可以发现光照组的细胞死亡明显高于黑暗组的,这说明 Poly-IR 光照后产生的 ROS 对肿瘤细胞具有明显的杀伤作用(图 5C).

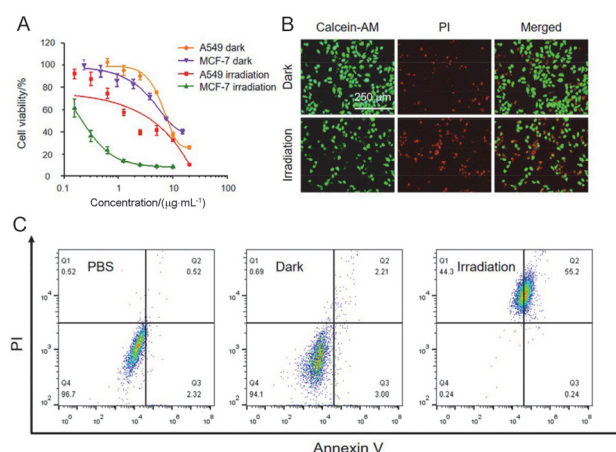


图 5 (A) Poly-IR 对 A549 及 MCF-7 细胞增殖的抑制效果(48 h); (B) A549 细胞孵育 Poly-IR 后在黑暗和光照 1 min 下的活死细胞染色图; (C) A549 细胞被不同条件处理后被 Annexin-FITC 和 PI 染色后流式凋亡分析(光照参数: 808 nm, 0.9 W/cm², 1 min)

Figure 5 (A) Viabilities of A549 and MCF-7 cells treated with Poly-IR; (B) live/dead staining of A549 cells treated with Poly-IR without or with near-IR irradiation for 1 min; (C) flow cytometry apoptosis assay of A549 cells after different treatments followed by staining with Annexin-FITC and PI (irradiation parameters: 808 nm, 0.9 W/cm², 1 min)

3 结论

本工作通过缩聚反应制备了可被近红外光激活的 IR-780 聚合物 Poly-IR. 该聚合物可在水中自组装成纳米粒子,其在溶液和细胞中都能够快速高效地产生活性氧. 并且 Poly-IR 能够有效富集在肿瘤细胞的线粒体中,近红外光照后产生的 ROS 可以有效破坏线粒体,导致线粒体膜电位的下降,并进一步导致肿瘤细胞的凋亡,

可以实现线粒体靶向的光动力治疗.

4 实验部分

4.1 仪器与试剂

仪器和试剂见支持信息.

4.2 IR-780-OH₂的合成

IR-780-OH₂参照文献合成^[27].

4.3 Poly-IR的合成

Poly-IR 按照合成路线如图 1A 所示. 将化合物 IR-780-OH₂ (67.1 mg, 0.10 mmol) 及 CBDA (23.5 mg, 0.12 mmol) 加入事先高温烘烤过的反应瓶中, 加入 5 mL 的无水二甲亚砜(DMSO), 60 °C 下在氩气环境中反应 3 d, 降至室温, 随后加入 mPEG-OH ($M_w=5000$) 100 mg, 换气, 并保持氩气环境, 30 °C 搅拌反应 24 h, 反应结束后, 将得到的聚合物溶液沉降到乙醚中, 过滤, 将得到的沉淀置于真空干燥箱中烘干后转移至截留分子量为 7500 的透析袋中, 用去离子水透析, 透析 3 d, 最后用 0.45 μm 的水相滤头过滤, 真空冻干. 上述实验操作全程避光.

4.4 单线态氧检测

Poly-IR 在 808 nm 激光器的照射下产生的活性氧可以通过 DPBF 作为指示剂来检测. 当 Poly-IR 被光照时, 产生的活性氧可以氧化 DPBF, 导致 DPBF 的紫外吸收降低, 故可以用紫外吸收光谱仪来检测活性氧产率. 将 Poly-IR 及 DPBF 溶于 DMF 中, 808 nm 的激光器照射溶液, 功率 0.9 W/cm², 每隔 15 s 进行紫外检测, 照射 1 min, 对照实验是在相同的条件下, DPBF 在光照下的淬灭速度. 单线态氧产率用以下公式计算:

$$\varphi_{\Delta(T)} = \varphi_{\Delta(\text{MB})} (k_T/k_{\text{MB}}) (I_{\text{MB}}/I_T)$$

φ_{Δ} 表示单线态氧产率, T 代表时间, k 代表淬灭速率; I 代表吸收校正因子, $I=1-10^{-\text{OD}}$, OD 代表化合物在光照波长下的紫外吸收值. 下标带有 MB 的代表与标准品亚甲基蓝相关的数据, 在 808 nm 波长照射时, DPBF 的降解速率与亚甲基蓝相近, 因此用 DPBF 代替亚甲基蓝, 其中 $\varphi_{\Delta(\text{MB})}=0.52$.

4.5 细胞中的单线态氧检测

将 A549 细胞用胰酶消化后, 分别以每孔 1×10^5 个细胞的浓度接种在事先放入盖玻片的 12 孔板中, 加入 1 mL 的 DMEM 培养基, 培养过夜, 使细胞充分贴壁. 随后每孔加入 1 mL 含有 Poly-IR 的 DMEM 培养基, 10 $\mu\text{g/mL}$ (按照 IR-780-OH₂ 计算), 细胞继续培养 4 h 后, 分别光照 1 min 和黑暗处理, PBS 洗涤后, 加入无血清稀释的 DCFH-DA 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 20 min, 随后, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤三次, 用激光共聚焦显微镜进行快速检测.

4.6 细胞器的定位分析

将 A549 细胞用胰酶消化后, 分别以每孔 1×10^5 个细胞的浓度接种在事先放入盖玻片的 12 孔板中, 加入 1 mL 的 DMEM 培养基, 培养过夜, 使细胞充分贴壁. A549、A2780 及 MCF-7 细胞给药孵育后, 只在黑暗条件下处理, PBS 洗涤, 每孔加入 1 mL 含有 200 nmol/L 的线粒体绿色荧光探针的无血清培养基, 继续培养 4 h. 移除含探针的培养基, PBS 洗三次, 每孔加入 0.5 mL 4% 的多聚甲醛固定 15 min, 移除多聚甲醛后用 PBS 洗三次, 再用 Milli-Q 水洗三次, 最后用 50% 的甘油封片. 用激光共聚焦扫描显微镜观察 Poly-IR 在细胞中的分布, Poly-IR 的激发通道为 555 nm, 以红光显示; 线粒体探针的激发通道为 488 nm, 以绿光显示.

4.7 线粒体膜电位检测

我们用 JC-1 探针检测 Poly-IR 产生的单线态氧对线粒体的影响, JC-1 是检测线粒体膜电位的一种荧光探针, 在正常细胞中 JC-1 是以聚集体形式存在, 产生红色荧光, 当线粒体膜被破坏后, 膜电位会降低, JC-1 会以单体形式存在, 产生绿色荧光. 因此利用 JC-1 从红色到绿色荧光的转变可以检测细胞中线粒体膜电位的下降. 按照上述步骤将 A549 细胞接种在 12 孔板中, 细胞孵育 Poly-IR 4 h 后, 分别光照 1 min 和黑暗处理, PBS 洗涤, 每孔加入含有 JC-1 荧光探针的 DMEM 培养基. 在培养箱中孵育 20 min 后用预冷的 JC-1 缓冲液洗两遍, 随后用激光共聚焦显微镜快速检测. JC-1 聚合物的最大激发波长为 585 nm, 采用 555 nm 的激发通道, 以红光显示; JC-1 单体的最大激发波长为 514 nm, 采用 488 nm 的激发通道, 以绿光表示.

4.8 细胞毒性评价

将 A549 及 MCF-7 细胞培养至对数生长期, 随后经胰酶消化后, 每孔加入 100 μL 含有 6×10^3 个细胞的培养基. 在含有 5% CO₂、37 °C 的培养箱中孵育 12 h, 使细胞完全贴壁. 将 Poly-IR 进行逐倍稀释, 给药后的最终有效浓度 (以 Poly-IR 定量) 为 0.156、0.312、0.625、1.25、2.5、5、10 和 20 $\mu\text{g/mL}$, 每个浓度设三个复孔, 继续培养 48 h. 其中 A549 细胞在加入 Poly-IR 内吞 4 h 后, 给予 808 nm, 0.9 W/cm² 光照 1 min, 光照结束后, 将细胞放回培养箱中继续黑暗条件下培养 44 h. 培养结束后, 每孔加入 20 μL 的 MTT (5 mg/mL) 溶液, 继续培养 4 h, 移除培养基, 每孔加入 150 μL 的 DMSO, 摇床低速震荡 2 min, 充分溶解, 用酶标仪检测每孔在 490 nm 处的 OD 值, 细胞存活率用以下公式计算:

$$\text{Cell viability (\%)} = \text{样品组/空白组} \times 100$$

为更直观地观察 Poly-IR 的抑制肿瘤细胞增殖的效果, 我们进一步用活死细胞染色实验来验证. 按照上述步骤将 A549 细胞用 Poly-IR 在 96 孔板中共培养 4 h, 分别光照 1 min 和黑暗处理后, 将细胞继续培养 2 h, 每孔

加入 150 μL 含有钙黄绿素(Calcein-AM, 75 ng/mL)和碘化丙啶(PI, 75 ng/mL)的 PBS, 在培养箱中继续孵育 30 min, PBS 洗涤, 随后将细胞样品用荧光显微镜成像。其中钙黄绿素检测活细胞, 它的最大激发波长为 494 nm, 采用 488 nm 激发通道进行检测, 产生的绿色荧光信号代表活细胞; 碘化丙啶检测死细胞, 它的最大激发波长为 535 nm, 采用 555 nm 激发通道进行检测, 产生的红色荧光信号代表死细胞。

随后, 用流式细胞仪来进一步表征 Poly-IR 的抑制肿瘤细胞增殖的效果。按照上述步骤将 A549 细胞均匀地接种在 6 孔板中, Poly-IR 孵育 4 h 后, 分别光照 1 min 和黑暗处理后, 将细胞消化下来, 离心并收集细胞, PBS 洗三次。随后每孔依次加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液, 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 工作液, 室温避光孵育 10~20 min 后, 用流式细胞仪进行检测。

References

- [1] Li, X.; Lovell, J. F.; Yoon, J.; Chen, X. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 657.
- [2] Liu, C.-H.; Cao, Y.; Cheng, Y.-R.; Wang, D.-D.; Xu, T.-L.; Su, L.; Zhang, X.-J.; Dong, H.-F. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1735.
- [3] Wang, T.; Zhao, L.; Wang, K.-W.; Bai, Y.-F.; Feng, F. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 600 (in Chinese). (王涛, 赵璐, 王科伟, 白云峰, 冯峰, 化学学报, **2021**, *79*, 600.)
- [4] Lismont, M.; Dreesen, L.; Wuttke, S. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 1606314.
- [5] Yan, T.; Liu, Z.-H.; Song, X.-Y.; Zhang, S.-S. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 657 (in Chinese). (闫涛, 刘振华, 宋昕玥, 张书圣, 化学学报, **2020**, *78*, 657.)
- [6] Huang, J.; Li, Z.; Liu, Z.-H. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 1049 (in Chinese). (黄菊, 李贞, 刘志洪, 化学学报, **2021**, *79*, 1049.)
- [7] Lo, P.-C.; Rodriguez-Morgade, M. S.; Pandey, R. K.; Ng, D. K. P.; Torres, T.; Dumoulin, F. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 1041.
- [8] Xie, J.-L.; Wang, Y.-W.; Choi, W.; Jangili, P.; Ge, Y.-Q.; Xu, Y.-J.; Kang, J.-L.; Liu, L.-Q.; Zhang, B.; Xie, Z.-J.; He, J.; Xie, N.; Nie, G.-H.; Zhang, H.; Kim, J. S. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 9152.
- [9] Cai, Z.; Zhang, Y.-W.; Jiang, L.-P.; Zhu, J.-J. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 481 (in Chinese). (蔡政, 张颖雯, 姜立萍, 朱俊杰, 化学学报, **2021**, *79*, 481.)
- [10] Lucky, S.-S.; Soo, K.-C.; Zhang, Y. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1990.
- [11] Xiong, H.-J.; Zhou, D.-F.; Zheng, X.-H.; Qi, Y.-X.; Wang, Y.-H.; Jing, X.-B.; Huang, Y.-B. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 3422.
- [12] Qin, Y.-B.; Yang, P.-X.; Shi, S.-B.; Sun, H.-F.; Zhang, C.-N.; Kong, D.-L. *Acta Polymerica Sinica* **2018**, *7*, 909 (in Chinese). (秦怡博, 杨鹏翔, 时圣彬, 孙洪范, 张闻年, 孔德领, 高分子学报, **2018**, *7*, 909.)
- [13] Wang, R.; Li, X.-S.; Yoon, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 19543.
- [14] Rustin, P. *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 352.
- [15] Yang, Z.-G.; Xiong, J.; Zhang, W.; Li, W.; Pan, W.-H.; Zhang, J.-G.; Gu, Z.-Y.; Huang, M.-N.; Qu, J.-L. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 130 (in Chinese). (杨志刚, 熊佳, 张炜, 李文, 潘文慧, 张建国, 顾振宇, 黄美娜, 屈军乐, 化学学报, **2020**, *78*, 130.)
- [16] Marrache, S.; Pathak, R. K.; Dhar, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 10444.
- [17] Wang, K.; Zhu, C.-C.; He, Y.-F.; Zhang, Z.-Q.; Zhou, W.; Muhammad, N.; Guo, Y.; Wang, X.-Y.; Guo, Z.-J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 4638.
- [18] Li, X.-Z.; Wu, J.-G.; Wang, L.; He, C.; Chen, L.-Y.; Jiao, Y.; Duan, C.-Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 6420.
- [19] Lv, W.; Zhang, Z.; Zhang, K. Y.; Yang, H.-R.; Liu, S.-J.; Xu, A.-Q.; Guo, S.; Zhao, Q.; Huang, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 9947.
- [20] Han, K.; Lei, Q.; Wang, S.-B.; Hu, J.-J.; Qiu, W.-X.; Zhu, J.-Y.; Yin, W.-N.; Luo, X.; Zhang, X.-Z. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 2961.
- [21] Jiang, C.-X.; Cheng, H.; Yuan, A.-H.; Tang, X.-L.; Wu, J.-H.; Hu, Y.-Q. *Acta Biomater.* **2015**, *14*, 61.
- [22] Mitra, K.; Lyons, C. E.; Hartman, M. C. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 10263.
- [23] Zhu, H.-J.; Li, J.-C.; Qi, X.-Y.; Chen, P.; Pu, K.-Y. *Nano Lett.* **2018**, *18*, 586.
- [24] Thomas, A. P.; Palanikumar, L.; Jeena, M. T.; Kim, K.; Ryu, J. H. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 8351.
- [25] Sun, J.; Du, K.; Diao, J.-J.; Cai, X.-T.; Feng, F.-D.; Wang, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 12122.
- [26] Zhang, Q.-F.; Kuang, G.-Z.; He, S.-S.; Lu, H.-T.; Cheng, Y.-L.; Zhou, D.-F.; Huang, Y.-B. *Nano Lett.* **2020**, *20*, 3039.
- [27] Yang, G.-L.; Tian, J.; Chen, C.; Jiang, D.-W.; Xue, Y.-D.; Wang, C.-C.; Gao, Y.; Zhang, W.-A. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 5766.

(Cheng, F.)