

## 介孔 TiO<sub>2</sub> 纳米粒在声动力学治疗肝细胞肝癌应用的生物相容性评估

王 希<sup>1</sup> 汤 阳<sup>1</sup> 张小龙<sup>1</sup> 徐亚丹<sup>1</sup> 王文平<sup>1,2△</sup>

(<sup>1</sup>复旦大学附属中山医院超声科 上海 200032; <sup>2</sup>复旦大学超声医学与工程研究所 上海 200032)

**【摘要】** 目的 评估介孔二氧化钛(titanium dioxide, TiO<sub>2</sub>)纳米粒在声动力学抗人肝癌 HepG2 肿瘤的生物安全性。方法 采用软模版法合成介孔 TiO<sub>2</sub> 纳米粒,与 HepG2 细胞共培养后通过噻唑蓝还原法评估毒性,应用荧光探针测定其介导声动力学治疗在 HepG2 细胞内产生活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的情况。采用血液凝集实验测评血液相容性,并通过静脉注射后小鼠血液生化指标及脏器组织切片 HE 染色来评估安全性。昆明小鼠与 HepG2 种植瘤裸鼠静脉给药后,在指定时间取脏器及肿瘤于王水中消化,应用电感耦合等离子体发射光谱绘制药物脏器分布图。结果 介孔 TiO<sub>2</sub> 纳米粒具有高度分散性和均一性,细胞共培养后显示无毒性,联合超声在 HepG2 细胞中产生 ROS。血液凝集实验所有指标、小鼠血液生化指标及脏器组织切片(最高剂量 150 mg/kg)与对照组差异均无统计学意义。静脉给药后主要分布于肝脾,8 h 达峰(含 51.32%),1 h 时肿瘤组织的药物分布达 6.74%,并于 24 h 内显现出维持浓度。结论 介孔 TiO<sub>2</sub> 纳米粒作为声敏剂能有效产生 ROS,具有良好静脉注射安全性,主要通过网状内皮系统代谢,能蓄积于肿瘤组织内为声动力学治疗提供良好时间窗口。

**【关键词】** 二氧化钛(TiO<sub>2</sub>); 介孔颗粒; 声动力学治疗; HepG2 细胞; 超声辐照

**【中图分类号】** TB559, R735.7 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2022.04.001

## Biocompatibility assessment of mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles for the application of sonodynamic treatment of hepatocellular cancer

WANG Xi<sup>1</sup>, TANG Yang<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-long<sup>1</sup>, XU Ya-dan<sup>1</sup>, WANG Wen-ping<sup>1,2△</sup>

(<sup>1</sup>Department of Ultrasound, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

<sup>2</sup>Institute of Ultrasound Medicine and Engineering, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】 Objective** To evaluate the biosafety of mesoporous titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in sonodynamic therapy against human HepG2 tumors. **Methods** Mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles were synthesized by soft-templating strategy, and toxicity was assessed after co-culture with HepG2 cells, and its generation of ROS in HepG2 cells mediated by sonodynamic therapy was measured by applying fluorescent probe. Blood coagulation assay was used to measure hemocompatibility, and safety was assessed by blood biochemical indices and HE staining of organ tissue sections in mice after intravenous injection. After intravenous administration of the drug in Kunming mice and HepG2 implanted tumor nude mice, the organs and tumors were taken at the designated time and digested in aqua regia, and inductively coupled plasma emission spectroscopy was applied to map the distribution of the drug organs. **Results** Mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles were highly dispersed and homogeneous, showed no toxicity after cell co-culture, and produced ROS in HepG2 cells by combined ultrasound. all indices of blood agglutination assay, blood

上海市自然科学基金(19ZR1450700, 20ZR1452800); 上海市临床重点专科项目(shslczdzk03501); 上海申康医院发展中心临床三年行动计划(SHDC2020CR1031B)

<sup>△</sup>Corresponding author E-mail: puguang61@126.com

网络首发时间: 2022-02-26 10:02:25 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1885.R.20220224.1134.012.html>

biochemical indices of mice and organ tissue sections (highest dose 150 mg/kg) were not significantly different from the control group. The drug was mainly distributed in the liver and spleen after intravenous administration, peaking at 8 h (containing 51.32 %) and reaching 6.74 % in the tumor tissue at 1h. The maintenance concentration was revealed within 24 h. **Conclusion** Mesoporous  $\text{TiO}_2$  nanoparticles as an sono-sensitizer can effectively generate ROS, have good safety of intravenous injection, metabolize mainly through the reticuloendothelial system, and can accumulate in the tumor tissue to provide a good time window for sonodynamic therapy.

**【Key words】** titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ); mesoporous particles; sonodynamic therapy; HepG2 cells; ultrasonic irradiation

\* This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (19ZR1450700, 20ZR1452800), Shanghai Municipal Key Clinical Specialty (shslczdk03501) and Clinical Three-year Action Plan of Shanghai Shenkang Hospital Development Center (SHDC2020CR1031B).

肝细胞肝癌是最常见的肝脏恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,其转移复发率、病死率高<sup>[2]</sup>,许多患者就诊时已处于中晚期,失去手术机会,高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)是目前声波治疗此类患者的重要手段之一,但对靶区周围正常组织及毗邻重要器官容易造成损伤<sup>[3]</sup>。声动力学治疗(sonodynamic therapy, SDT)利用声敏剂对肿瘤的靶向定位,从而实现对低强度声波照射部位肿瘤组织的选择性杀伤及正常组织的保护<sup>[4-5]</sup>,是声波治疗实体瘤的研究新热点。

优秀的声敏剂不仅能有效杀伤肿瘤,且具备组织无毒性。传统有机类(卟啉类为代表)声敏剂稳定性、分散性和可修饰性差,很难实现静脉给药,且兼具光敏物质的毒性反应和不良反应。无机二氧化钛(titanium dioxide,  $\text{TiO}_2$ )纳米粒作为声敏剂显示出理想的稳定性和安全性以及优秀的杀伤细胞能力<sup>[6]</sup>。然而传统  $\text{TiO}_2$  纳米粒具有容易聚集的问题<sup>[7]</sup>,一定程度限制了  $\text{TiO}_2$  纳米粒的医学应用,其家族新成员介孔  $\text{TiO}_2$  纳米粒具有清晰的介孔形貌,其有机-无机杂化以及表面可修饰性对实现特定的纳米医学应用打开了新窗口<sup>[8]</sup>。本研究旨在探讨介孔  $\text{TiO}_2$  纳米粒作为声敏剂应用的安全性,代谢情况以及声动力治疗的可行性。

## 资料和方法

**主要实验试剂及仪器设备** 主要试剂:钛酸四丁酯(TBT),醋酸(HAc),PBS溶液,去离子水,乙醇,聚乙二醇( $\text{NH}_2\text{-PEG}_{5000}$ );MTT试剂盒,2',7'-二

氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA),HemosIL™试剂盒;新鲜人血浆(上海市血液中心)。仪器设备:50 mL水热反应釜,透射电子显微镜,Nano ZS90动态光散射仪,Bio-Tek EL×800酶标仪,ITO US-100型超声治疗仪,荧光显微镜IX81,ACL7000全自动血凝分析仪,等离子体原子发射光谱仪ICP,7170全自动生化分析仪。

**制备介孔  $\text{TiO}_2$  纳米粒** 溶剂热处理预水解软模板合成法:将醋酸15 mL与1 mL钛酸四丁酯在水热釜中充分磁力搅拌后加入0.5 mL去离子水,150℃水热处理12 h,冷却至室温,离心收集产物(13 000 r/min,离心半径:10 cm,离心时间:10 min,全文同),分别于乙醇及去离子水中共洗涤3次,离心收集产物,分散于去离子水中。加入聚乙二醇 $\text{NH}_2\text{-PEG}_{5000}$ 的去离子水溶液(0.5 mg/mL,100 mL),磁力搅拌48 h后离心收集并于去离子水中洗涤3次。

**介孔  $\text{TiO}_2$  纳米粒介导声动力学对 HepG2 细胞的作用** 实验分为对照组、 $\text{TiO}_2$  纳米粒共培养组、超声辐照组和SDT组(声动力治疗组)。将HepG2肿瘤细胞接种至共聚焦专用培养皿,细胞贴壁后 $\text{TiO}_2$  纳米粒共培养组及SDT组换以50  $\mu\text{g/mL}$  浓度 $\text{TiO}_2$  纳米粒的培养液。继续共培养12 h,用PBS小心冲洗。在4组共聚焦培养皿中加入DCFH-DA溶液(调整终浓度为10  $\mu\text{mol/L}$ ),避光静置20 min。超声辐照组及SDT组采用1.5 W/ $\text{cm}^2$ ,占空比20%,时长60 s的超声参数于培养皿底部(不含气无菌耦合剂)对行超声辐照。在激光共聚焦荧光显微镜下,选择488 nm激发波长和525 nm发射波长观察细胞情况。

将 HepG2 肿瘤细胞 ( $5 \times 10^3$ /孔, 每孔 100  $\mu$ L) 接种至 96 孔板中, 细胞贴壁后用梯度浓度 (25、50、100、200、400  $\mu$ g/mL) TiO<sub>2</sub> 纳米粒的培养液替换原培养基。孵育结束后, 用培养液清洗 2 次。每孔加入 0.6 mg/mL MTT 的培养液, 共培养 4 h 后弃液加入 100  $\mu$ L DMSO, 在 Bio-TekEL $\times$ 800 酶标仪上测试吸光度 ( $\lambda=490$  nm)。细胞存活情况以百分比表示 ( $n=6$ )。

**介孔 TiO<sub>2</sub> 纳米粒静脉注射安全性评估** TiO<sub>2</sub> 纳米粒配制成梯度浓度的 PBS 溶液 (25、50、100、200、300 和 500  $\mu$ g/mL,  $n=5$ )。取 50  $\mu$ L 的混合溶液加入到 450  $\mu$ L 人血浆中, 离心后吸取上清液, 采用 HemosIL<sup>TM</sup> 试剂盒, 在全自动凝血分析仪中, 检测凝血酶原时间 (prothombin time, PT)、纤维蛋白原 (fibrinogen, FIB) 和活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT), 以不加血浆作为空白对照。

实验采用 SPF 级昆明小鼠, 将 TiO<sub>2</sub> 纳米粒配置成生理盐水溶液, 通过尾静脉注射给药, 梯度给药剂量为 10、50、150 mg/kg ( $n=5$ , 0.1 mL/只)。2 周后, 用眼球后静脉采集血液标本, 部分收集在 EDTA K2 抗凝管进行全血测定, 部分离心取上清于 7170 型全自动生化分析仪进行生化检测 (血常规、肝功能、肾功能)。取心、肺、肝、脾、肾组织块, 经 4% 甲醛固定后, 常规石蜡包埋, 4  $\mu$ m 厚度切片进行 HE 染色并观察。

**介孔 TiO<sub>2</sub> 纳米粒代谢分布研究** 建立人 HepG2 裸鼠种植瘤模型: 将 HepG2 细胞悬液 100  $\mu$ L (约  $5 \times 10^6$  个) 细胞接种于 Balb/c 裸鼠右侧肩背部皮下, 7 天后裸鼠注射部位皮下均出现种植瘤, 14 天后瘤体直径约 10 mm 开始实验。将 TiO<sub>2</sub> 纳米粒配置成无菌生理盐水溶液, 通过尾静脉注射给药, 每只剂量 50 mg/kg, 注射剂量为 0.1 mL。昆明小鼠于注射前和注射后 24 h、1 周、4 周的时间点, 荷瘤裸鼠于注射前和注射后 1、2、4、8、18 及 24 h, 用颈椎脱臼法处死 ( $n=5$ ), 取主要器官组织 (心、肝、脾、肺、肾) 及皮下肿瘤组织 (荷瘤裸鼠), 分别称重并记录, 放置于王水 (浓盐酸: 浓硝酸=1:3) 中充分消化后, 用电感耦合等离子体发射光谱 (inductively coupled plasma optical emission spectrometer, ICP-OES) 测定 Ti 元素浓度 (功率: 1.20 kw; 等离子气体流量: 15.0 L/min; 雾化气压力: 200 kPa; 泵速:

15.0 r/min)。最后, 采用 (组织中 Ti 含量/注射剂量)/组织重量, 即 ID%/g 计算各器官组织中 TiO<sub>2</sub> 纳米粒的聚集浓度。

**统计学分析** 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 两组均数比较用 LSD 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

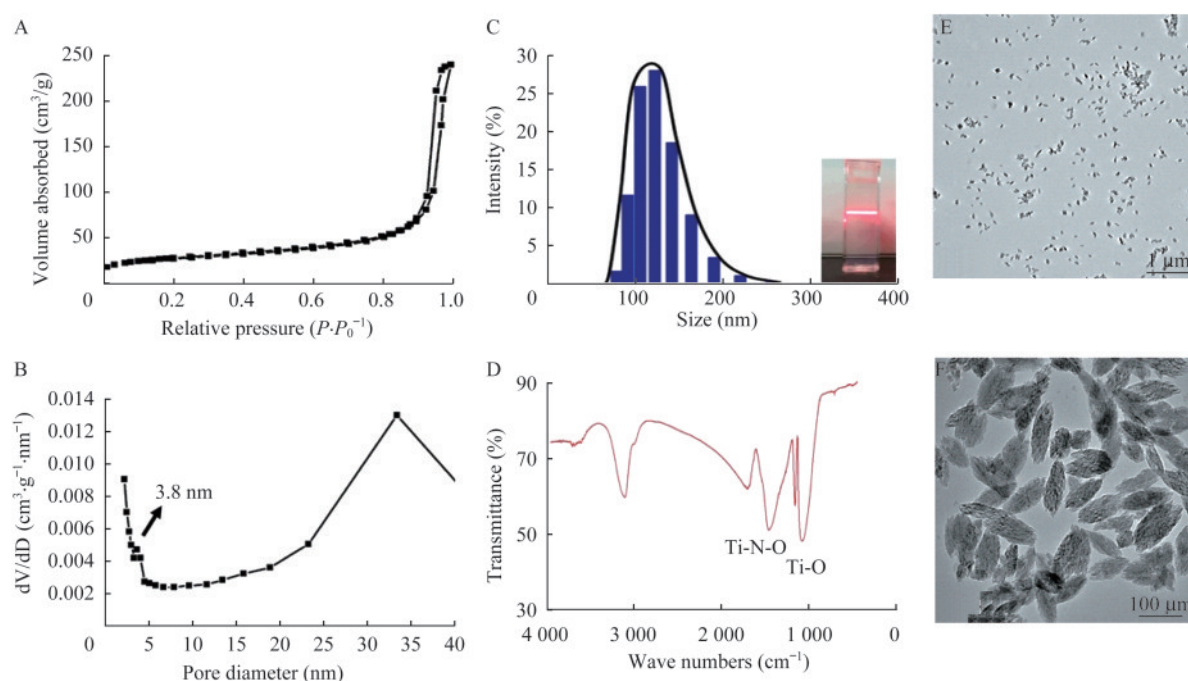
## 结 果

**介孔 TiO<sub>2</sub> 纳米粒理化性质** 通过 N<sub>2</sub> 吸附-解吸技术明确了其介孔特性, 所得 BET 比表面积、孔容以及孔径分别为 96 m<sup>2</sup>/g, 0.27 cm<sup>3</sup>/g 以及 3.8 nm (图 1A、B)。通过动态光散射 DLS 分析, 高度分散的椭圆形纳米粒平均粒径为 124.0 nm, 其水溶液显现出良好的丁达尔现象, 即入射光遇到液体中的粒子发生了散射现象呈现出均匀光带, 提示纳米颗粒在水溶液中符合胶体系的特性 (图 1C), PEG 化的纳米粒通过傅立叶变换 (fourier transform infrared, FTIR) 红外光谱分析, 在 1 500 cm<sup>-1</sup> 光谱范围区出现吸收峰, 对应 Ti-N-O 基团的存在 (图 1D)。

**介孔 TiO<sub>2</sub> 纳米粒介导声动力学对 HepG2 细胞的作用** MTT 还原测试结果表明, 各梯度浓度介孔 TiO<sub>2</sub> 纳米粒共培养 24 h 后, 人肝癌 HepG2 细胞的相应存活率 ( $n=4$ ) 为: 99.02%  $\pm$  3.15% (25  $\mu$ g/mL)、99.85%  $\pm$  7.02% (50  $\mu$ g/mL)、97.62%  $\pm$  4.83% (100  $\mu$ g/mL)、94.14%  $\pm$  6.32% (200  $\mu$ g/mL)、95.30%  $\pm$  7.86% (400  $\mu$ g/mL), 与对照组比较差异均无统计学意义。

在超声激活纳米粒诱导 HepG2 细胞内产生 ROS 实验中, 超声单独治疗组以及纳米粒共培养组中, 均未呈现出荧光显像, 而在 SDT 组细胞内, 观察到了 DCF 所呈现的绿色荧光, 表明在这一组肿瘤细胞内产生了大量的 ROS (图 2)。相同超声参数及纳米粒浓度下, MTT 测试超声辐照组细胞存活率为 97.05%  $\pm$  2.27%, SDT 组存活率为 78.09%  $\pm$  4.42%。

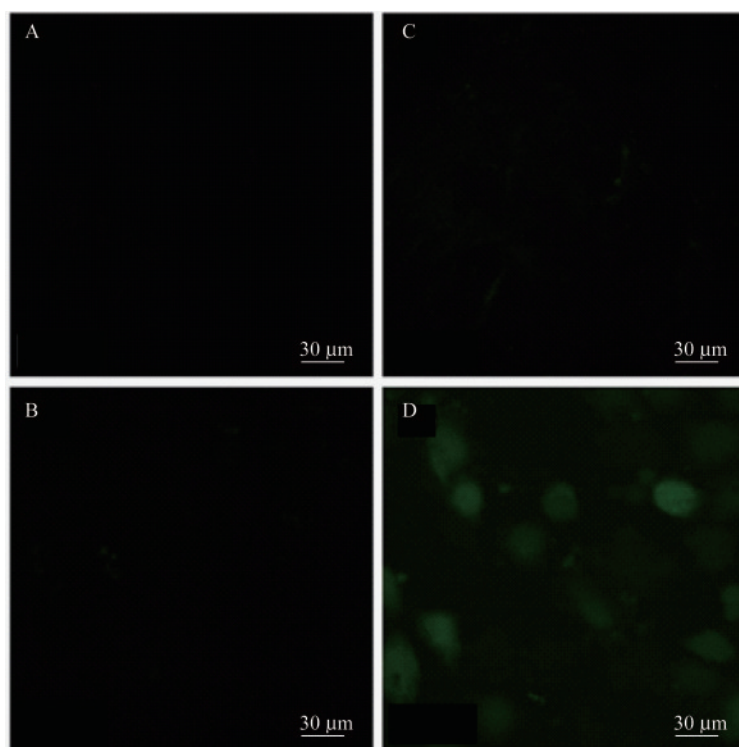
**介孔 TiO<sub>2</sub> 纳米粒静脉注射安全性评估** 测得 PT、FIB 和 APTT 见图 3。25、50、100、200、300 和 500  $\mu$ g/mL 浓度的 PEG-MTNs 的 PT 值 (s) 分别为 16.45  $\pm$  0.06、16.07  $\pm$  0.11、16.57  $\pm$  0.06、16.50  $\pm$  0.10、16.33  $\pm$  0.12、16.13  $\pm$  0.11 和 15.70  $\pm$  0.17。FIB 值 (g/L) 的样品测值分别为 2.52  $\pm$  0.05、2.80  $\pm$  0.04、2.66  $\pm$  0.16、2.66  $\pm$  0.16、2.56  $\pm$  0.06、2.52  $\pm$  0.05 和



A: Nitrogen adsorption-desorption isothermal curves; B: Mesopore pore size distribution suggesting a mesopore pore size of 3.8 nm; C: Dynamic light scattering analysis spectrum with inset showing the Tyndall effect in aqueous solution; D: FTIR spectrum analysis; E and F: Transmission electron microscopy (TEM) photographs showing the homogeneity and dispersion of nanoparticles.

图1 介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒理化性质

Fig 1 Physicochemical properties of mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles



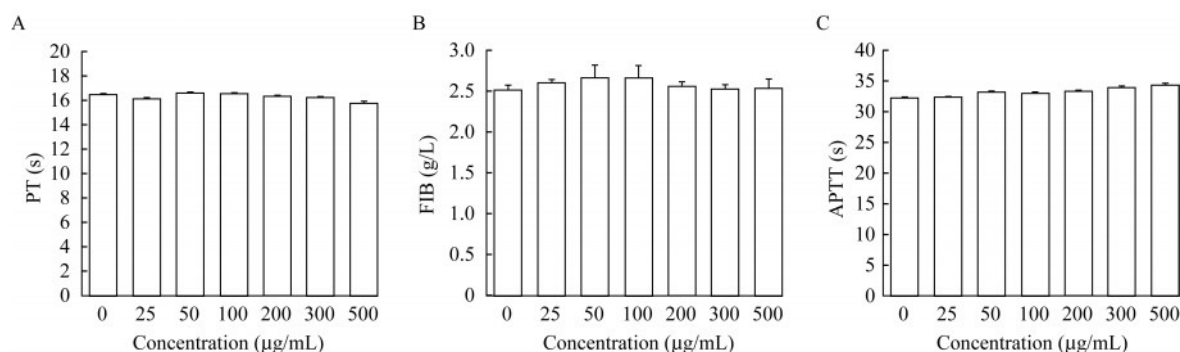
A: Control group; B: TiO<sub>2</sub> nanoparticle co-culture group; C: Ultrasonic irradiation group; D: SDT group. HepG2 cells in SDT group showed green fluorescence after DCFH-DA staining.

图2 DCFH-DA显影介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒介导声动力治疗后细胞内ROS

Fig 2 DCFH-DA showing intracellular ROS by mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles mediated sonodynamic therapy



2.52 ± 0.11。APTT 值(s) 的样品测值分别为 0.23、33.43 ± 0.12、34.03 ± 0.15 和 34.43 ± 0.23。各浓度样品间同一指标的测值差异均无统计学意义。



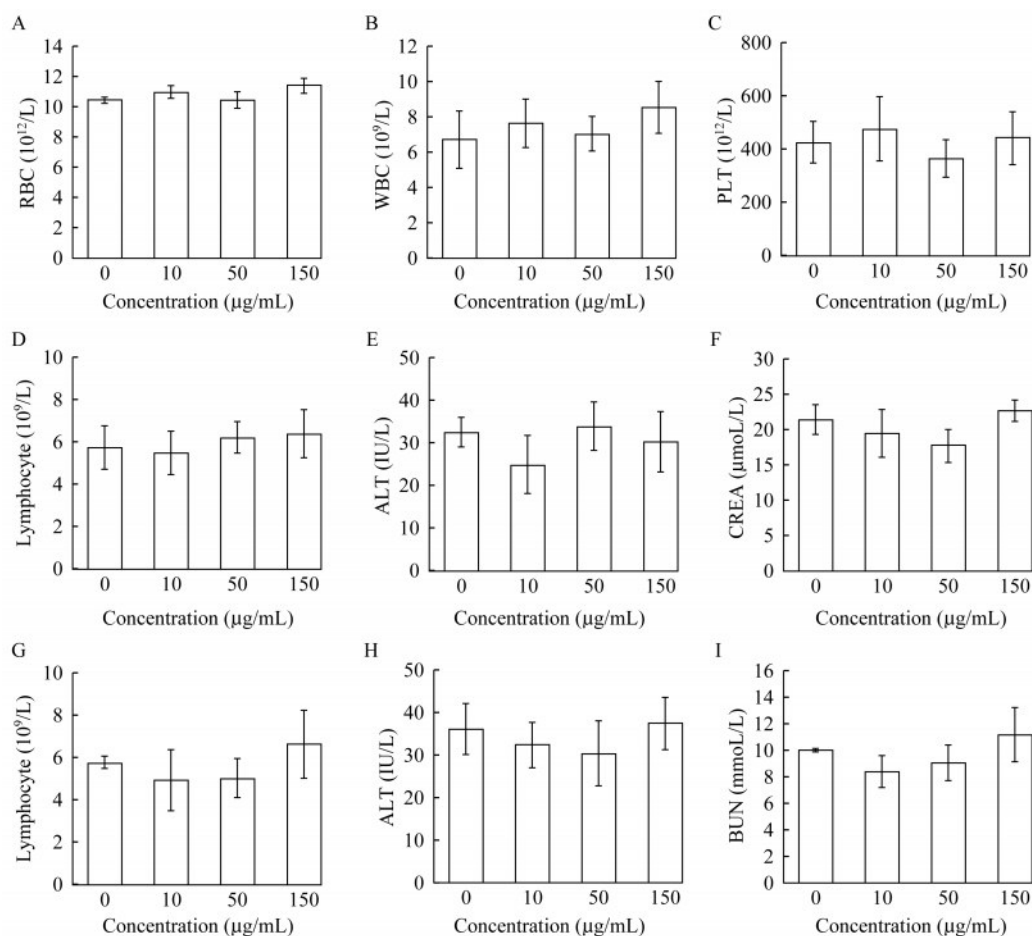
PT: Prothombin time; FIB: Fibrinogen; APTT: Activated partial thromboplastin time.

图3 介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒血液凝集实验

Fig 3 Coagulation assay of mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles

尾静脉注射介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒后2周内,无动物给药后死亡,小鼠皮肤未发现明显破损,未发现明显的脱毛现象,小鼠无异常行为(包括异常的发声、呼吸困难,行动困难,易激惹或攻击行为等)。小鼠

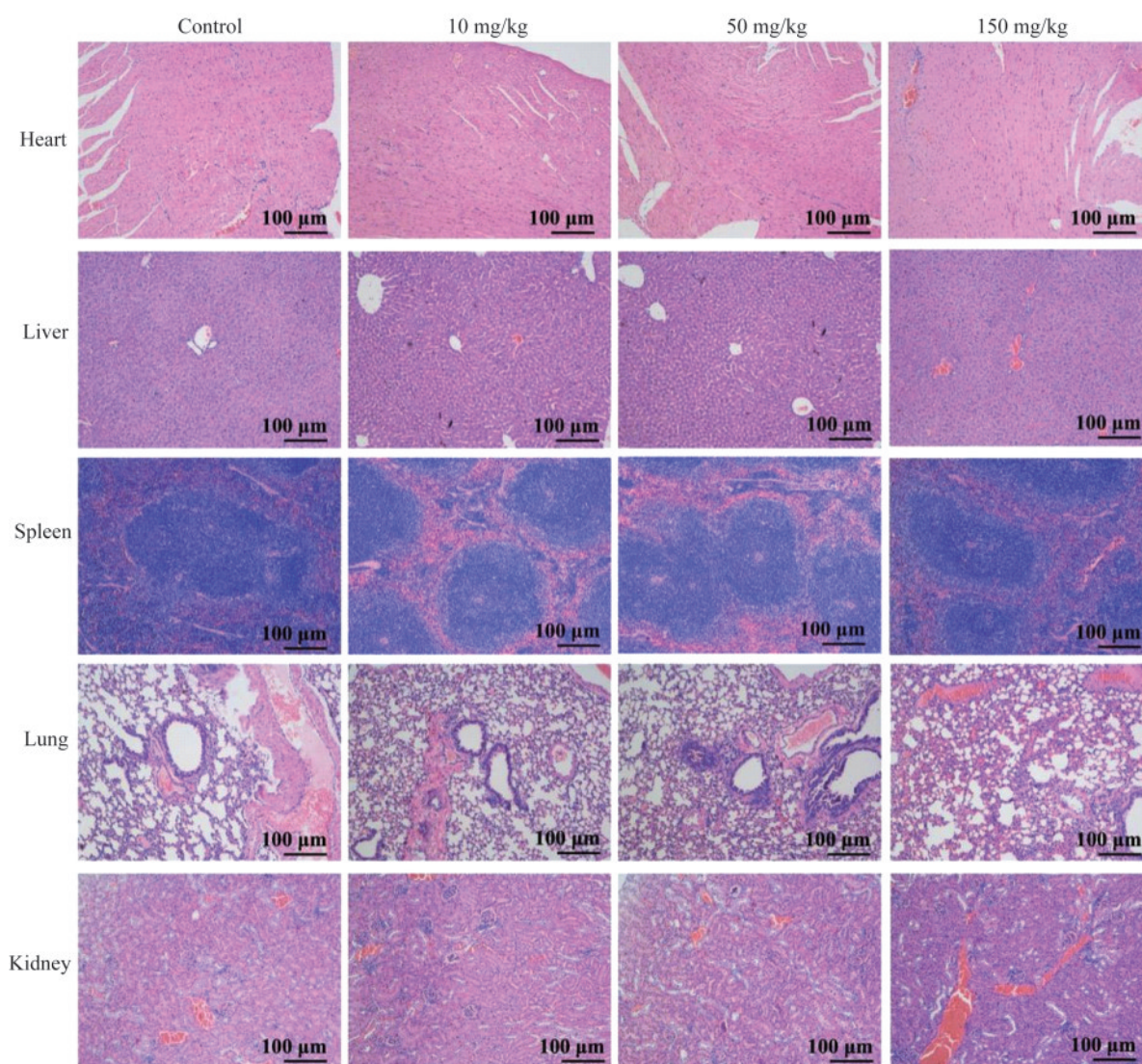
所有血液学指标和生化指标结果与对照组比较,差异均无统计学意义(图4)。各梯度给药剂量组的重要脏器组织切片HE染色结果显示,组织结构清晰完整,与对照组相比较,未发现明显差异(图5)。



Blood and biochemical results of mice at different intravenous doses (0, 10, 50, 150 mg/kg).

图4 介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒静脉注射后小鼠血常规及肝肾功能检测

Fig 4 Hematology, liver and kidney function in mice after intravenous injection of mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles



The heart, liver, spleen, lung and kidney tissues of mice at different intravenous doses (0, 10, 50, 150 mg/kg) were sectioned and stained by HE, and the selected data are representative stained photographs of the same dose groups.

图5 介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒静脉注射后小鼠内脏切片HE染色

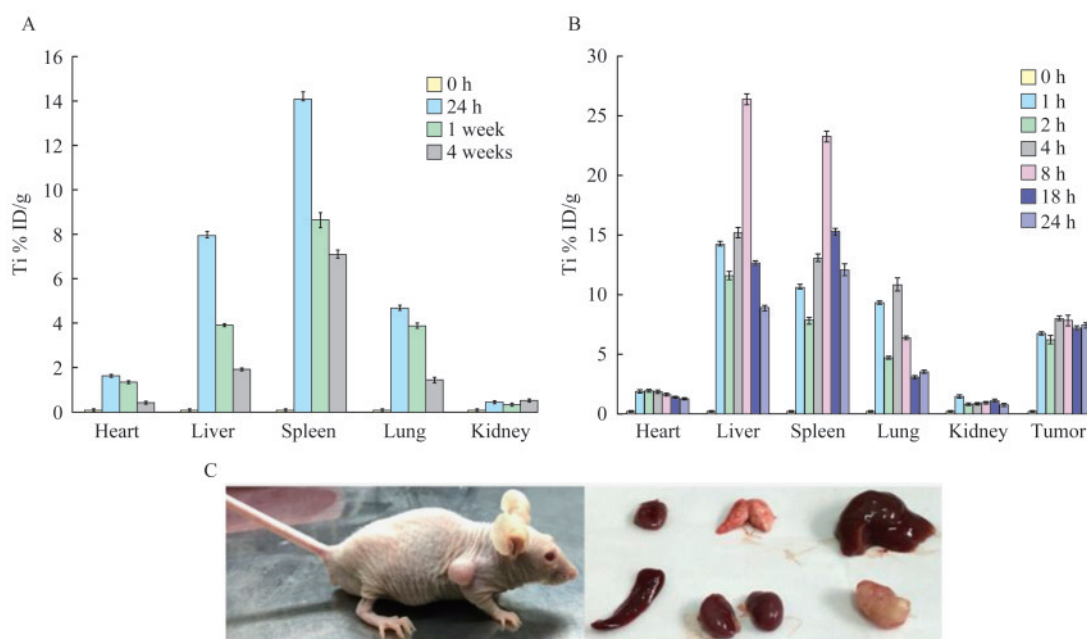
Fig 5 HE staining of mouse visceral sections after intravenous injection of mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles

**介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒代谢分布研究** ICP-OES测定结果根据(组织中Ti含量/注射剂量)/组织重量计算后,如图6所示。介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒通过体循环浓聚在网状内皮系统肝脾组织(注射后24 h达22.34 %总Ti量)并在1个月内逐渐代谢完全(图6A)。在HepG2种植瘤裸鼠研究中,肝脾组织在2 h的Ti含量较1 h降低( $P<0.05$ ),而4 h时呈现明显上升( $P<0.05$ ),8 h达峰(51.32%),随后出现较大幅度的下降。此外,注射后1 h肿瘤组织Ti含量达到6.74%,并于1天内呈现维持浓度。

## 讨 论

声动力学治疗是对肿瘤部位先给予声敏剂,后用低强度超声对肿瘤部位进行辐照,产生ROS从而杀伤肿瘤<sup>[5,9]</sup>。SDT研究初期,声敏剂选择主要为部分光敏剂,集中在卟啉类有机物<sup>[10-11]</sup>(5-ALA, ATX-70等),然而其稳定性和分散度欠佳,难以通过增强的高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)沉积于肿瘤组织,影响ROS产能,且常伴随光照性皮炎等不良反应。新近的研究通





A: Distribution of nanoparticles in each organ of mice before (0 h), 24 h, 1 w and 4 w after injection; B: Distribution of nanoparticles in each major organ and tumor tissue of tumor bearing nude mice before (0 h), 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 18 h and 24 h after injection; C: Major organs (heart, liver, spleen, lung and kidney) and tumor tissues of nude mice weighed and then disintegrated in aqua regia.

图6 ICP-OES测定介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒静脉注射后代谢分布

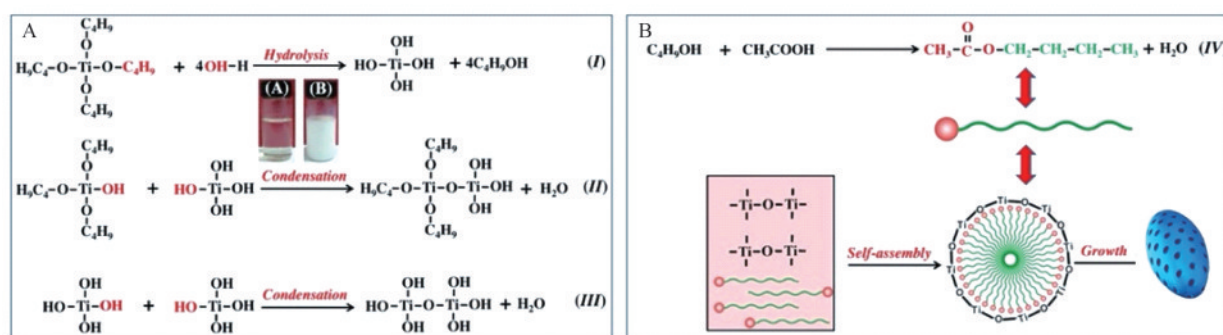
Fig 6 Metabolic distribution of nanoparticles determined by ICP-OES after intravenous injection of mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles

过脂质体包裹<sup>[12-13]</sup>、无机纳米粒携带<sup>[14-15]</sup>、自组装纳米粒<sup>[16]</sup>为有机声敏剂开辟了新道路。无机TiO<sub>2</sub>因生物安全性良好近年受到SDT领域的关注<sup>[6,17]</sup>,然而其本身的化学特性限制了静脉给药。

本研究采用新颖的软模板方法成功合成了具有良好分散度和均一性的椭圆形介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒(图1),其中最低能量原则即具有热力学稳定性质的脱钛矿二氧化钛Wulff结构占据了主导地位(高达94%)<sup>[18-19]</sup>。钛前驱体遇水后水解产生钛的低聚物以及正丁醇,而后凝结形成Ti-O-Ti框架。原位形成的醋酸丁酯具有相对较长的碳链能形成微团,与水解/凝结的钛低聚物共同形成纳米介孔的结构(图7)。这种有机/无机的自组装过程类似于传统无机介孔硅的形成过程<sup>[20-21]</sup>。通过非共价键形式连接NH<sub>2</sub>-PEG5<sub>000</sub>的氨基和纳米粒的Ti,进一步改善溶液中的稳定性。可见光(波长在400~700 nm)透过纳米粒水溶液呈现出的丁达尔现象(图1C)提示其水溶液符合胶体系特性,具有高度分散性和理想直径,为静脉注射提供了保障。

在声动力学法抗肿瘤的众多机制理论<sup>[5,9]</sup>中,超声空化作用产生ROS被广泛认可。超声能激活有机类声敏剂在肿瘤细胞内产生ROS<sup>[10,22-23]</sup>,上调凋亡相关蛋白(如Bax、Caspase-9等)<sup>[24]</sup>,损坏线粒体,

诱导细胞凋亡。本实验用荧光探针DCFH-DA进行ROS测定。1.5 W/cm<sup>2</sup>、占空比20%、时长60 s的超声参数下,超声辐照组细胞存活率为97.05%±2.27%,证明了该参数对细胞的安全性,而在加入纳米粒(50 μg/mL)后,存活率下降至78.09%±4.42%,表明该参数能诱导纳米粒损伤细胞,而非超声热效应和机械效应杀伤细胞。当探针与HepG2细胞共孵育时,DCFH-DA穿过细胞膜水解成DCFH滞留于细胞内,后进行超声辐照即刻观察。所有组别中仅SDT组的细胞内观察到了绿色荧光(DCFH被ROS转化成了DCF),表明纳米粒能大量进入细胞质内发挥声敏作用产生ROS。超声辐照所产生的空化效应能介导声光触发和热解反应,进一步激活具有半导体性质的TiO<sub>2</sub>纳米粒,使之从高电子能的价带产生电子(e<sup>-</sup>)形成低电子能的导带,造成价带出现电子空穴(h<sup>+</sup>)。电子(e<sup>-</sup>)和电子空穴(h<sup>+</sup>)进一步与溶解的氧分子及水分子进行反应,从而产生具有毒性的ROS(O<sub>2</sub><sup>-</sup>、HO<sub>2</sub>和OH)<sup>[6,16-17]</sup>。近年TiO<sub>2</sub>抗肿瘤的研究也印证了ROS理论<sup>[25-27]</sup>。此外,粒径(124 nm)大小使其本身成为了空化核,增加超声声能在细胞质内沉积从而局部增强SDT作用,几种因素产生的大量ROS在细胞质内直接损伤细胞。



A: Mechanism of synthesis of -Ti-O-Ti- framework structure based on sol-gel method. The inset shows the photos before and after the hydrolysis and coalescence of TBT triggered by the addition of water after TBT dissolved in acetic acid. B: Butyl acetate was produced by the esterification reaction between TBT and acetic acid after hydrolysis, followed by pre-hydrolysis with precursors of pre-condensed titanium to form microcystic-like soft templates, which eventually produced mesoporous structures.

图7 介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒合成机制及微结构

Fig 7 Mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles nanoparticle synthesis mechanism and microstructure

声敏剂不仅要求高ROS产能,还应具有良好的生物相容性,其化学特性、药代动力学特征都是SDT疗效的关键<sup>[28]</sup>。共培养实验中,在最高400 μg/mL纳米粒浓度条件下,细胞存活率依然高达95.30%,表明位于胞质中的纳米粒没有对细胞器产生损伤,印证了其无毒或极低毒性的特性。

为确保静脉途径给药,血液相容性评估尤为重要。本研究将APTT作为内源性凝血因子缺乏的筛选试验,PT反映外源性凝血系统情况,FIB反映纤维蛋白原的含量。所有指标在各纳米粒浓度组间无明显差异,表明没有激活凝血途径,对血浆的凝血/抗凝性能没有明显影响。部分介孔材料由于比表面积大,吸附容量高而易引起凝血。本研究合成的纳米粒比表面积小,预先PBS浸润减少吸附,均有效降低凝血的激活。实验进一步通过小鼠血液系统(三系情况)和生化指标(肝、肾功能),以及主要脏器HE染色观察来全面评估静脉注射后的生物安全性。静脉注射2周内没有出现动物死亡,呼吸困难或行为异常。血液生化指标与对照组间均无显著差异,组织切片观察没有异常(图3、4),证实了介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒静脉注射的生物安全性,蓄积于脏器的纳米粒对正常细胞较为安全。

我们从纳米粒药代分布研究结果推测纳米粒通过静脉进入体循环后,2 h时已有部分代谢,而4 h时网状内皮系统通过血液循环拦截了身体其他部分代谢的纳米粒而呈现上升的趋势。此外,注射后1 h肿瘤组织Ti含量达到6.74%,并于1天内呈现维持浓度,证实纳米粒能通过静脉途径有效蓄积于肿

瘤组织。由此,找准组织低浓度、肿瘤高浓度的时间窗为SDT的应用奠定了基础。

本研究采用软模版方法合成了介孔TiO<sub>2</sub>纳米粒,系统性证实了其无毒性 and 静脉注射安全性,并从药物代谢特点为SDT应用找到时间窗口。介孔结构赋予其进一步作为药物载体与SDT协同抗肿瘤作用的潜能,为基于TiO<sub>2</sub>的生物纳米系统在生物医学领域的应用开辟了一条新的道路。

**作者贡献声明** 王希 构思和设计,文献调研,可行性分析,构建模型,数据分析和保存,绘制图表,获取资助,完成实验,论文撰写和修订。汤阳,张小龙,徐亚丹 文献调研和整理,数据搜集,执行实验,构建模型,绘制图表。王文平 构思和设计,可行性分析,监督指导,获取资助,论文修订。

**利益冲突声明** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## 参 考 文 献

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] EL-SERAG HB, MARRERO JA, RUDOLPH L, *et al.* Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1752-1763.
- [3] 王希, 王文平. 纳米生物技术在HIFU抗肿瘤治疗中的研究进展[J]. *复旦学报(医学版)*, 2016, 43(6): 732-737.
- [4] UMEMURA S, YUMITA N, NISHIGAKI R, *et al.* Mechanism of cell damage by ultrasound in combination with hematoporphyrin[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1990, 81(9): 962-966.



- [ 5 ] YANG Y, TU J, YANG D, *et al.* Photo- and sono-dynamic therapy: a review of mechanisms and considerations for pharmacological and agents used in therapy incorporating light and sound[J]. *Curr Pharm*, 2019, 25(4): 401-412.
- [ 6 ] NINOMIYA K, NODA K, OGINO C, *et al.* Enhanced OH radical generation by dual-frequency ultrasound with TiO<sub>2</sub> nanoparticles: its application to targeted sonodynamic therapy[J]. *Ultrason Sonochem*, 2014, 21(1): 289-294.
- [ 7 ] LU J, LIU DM, YANG XN, *et al.* Sedimentation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in aqueous solutions: influence of pH, ionic strength, and adsorption of humic acid[J]. *Desalination Water Treatment*, 2015, 57(40): 18817-18824.
- [ 8 ] CHEN Y, SHI J. Chemistry of mesoporous organosilica in nanotechnology: molecularly organic-inorganic hybridization into frameworks[J]. *Adv Mater*, 2016, 28(17): 3235-3272.
- [ 9 ] SON S, KIM JH, WANG X, *et al.* Multifunctional sonosensitizers in sonodynamic cancer therapy [J]. *Chem Soc Rev*, 2020, 49(11): 3244-3261.
- [ 10 ] SONG W, CUI H, ZHANG R, *et al.* Apoptosis of SAS cells induced by sonodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid sonosensitizer[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(1): 39-45.
- [ 11 ] KUROKI M, HACHIMINE K, ABE H, *et al.* Sonodynamic therapy of cancer using novel sonosensitizers [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(6A): 3673-3677.
- [ 12 ] YANG C, ZHANG Y, LUO Y, *et al.* Dual ultrasound-activatable nanodroplets for highly-penetrative and efficient ovarian cancer theranostics[J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(3): 380-390.
- [ 13 ] LIU Y, BAI L, GUO K, *et al.* Focused ultrasound-augmented targeting delivery of nanosonosensitizers from homogenous exosomes for enhanced sonodynamic cancer therapy[J]. *Theranostics*, 2019, 9(18): 5261-5281.
- [ 14 ] HUANG J, LIU F, HAN X, *et al.* Nanosonosensitizers for highly efficient sonodynamic cancer theranostics [J]. *Theranostics*, 2018, 8(22): 6178-6194.
- [ 15 ] ZHANG P, REN Z, CHEN Z, *et al.* Iron oxide nanoparticles as nanocarriers to improve chlorin e6-based sonosensitivity in sonodynamic therapy[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 4207-4216.
- [ 16 ] LIANG S, DENG X, MA P, *et al.* Recent Advances in nanomaterial-assisted combinational sonodynamic cancer therapy[J]. *Adv Mater*, 2020, 32(47): e2003214.
- [ 17 ] ÇEŞMELİ S, BIRAY AVCI C. Application of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in cancer therapies[J]. *J Drug Target*, 2019, 27(7): 762-766.
- [ 18 ] HAN X, KUANG Q, JIN M, *et al.* Synthesis of titania nanosheets with a high percentage of exposed (001) facets and related photocatalytic properties [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(9): 3152-3153.
- [ 19 ] YANG HG, SUN CH, QIAO SZ, *et al.* Anatase TiO<sub>2</sub> single crystals with a large percentage of reactive facets[J]. *Nature*, 2008, 453(7195): 638-641.
- [ 20 ] ZHAO D, FENG J, HUO Q, *et al.* Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores[J]. *Science*, 1998, 279(5350): 548-552.
- [ 21 ] WAN Y, ZHAO D. On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates [J]. *Chem Rev*, 2007, 107(7): 2821-2860.
- [ 22 ] LI JH, YUE W, HUANG Z, *et al.* Calcium overload induces C6 rat glioma cell apoptosis in sonodynamic therapy [J]. *Int J Radiat Biol*, 2011, 87(10): 1061-1066.
- [ 23 ] WANG X, LEUNG AW, JIANG Y, *et al.* Hypocrellin B-mediated sonodynamic action induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Ultrasonics*, 2012, 52(4): 543-546.
- [ 24 ] DAI S, HU S, WU C. Apoptotic effect of sonodynamic therapy mediated by hematoporphyrin monomethyl ether on C6 glioma cells *in vitro* [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2009, 151(12): 1655-1661.
- [ 25 ] HAN X, HUANG J, JING X, *et al.* Oxygen-deficient black titania for synergistic/enhanced sonodynamic and photoinduced cancer therapy at near infrared-II biowindow [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(5): 4545-4555.
- [ 26 ] SU K, TAN L, LIU X, *et al.* Rapid photo-sonotherapy for clinical treatment of bacterial infected bone implants by creating oxygen deficiency using sulfur doping [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(2): 2077-2089.
- [ 27 ] YOU DG, DEEPAGAN VG, UM W, *et al.* ROS-generating TiO<sub>2</sub> nanoparticles for non-invasive sonodynamic therapy of cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23200.
- [ 28 ] LAFOND M, YOSHIKAWA S, UMEMURA SI. Sonodynamic therapy: advances and challenges in clinical translation[J]. *J Ultrasound Med*, 2019, 38(3): 567-580.

(收稿日期:2021-07-28; 编辑:王蔚)