

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.08.028

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190327.0937.010.html>(2019-03-27)

靶向纳米探针在结直肠癌干细胞荧光成像及光热治疗中的研究*

曹永¹, 吕强², 孙迎燕³, 高晓虹^{4△}

(1. 遵义医学院法医病理教研室, 贵州遵义 563099; 2. 牡丹江医学院医药研究中心, 黑龙江牡丹江 157011; 3. 牡丹江医学院红旗医院超声科, 黑龙江牡丹江 157011; 4. 牡丹江医学院生物技术实验室, 黑龙江牡丹江 157011)

[摘要] **目的** 制备 CD44v6 功能化上转换纳米粒子(UCNPs)探针, 用于结直肠癌肿瘤干细胞(CSC)的早期诊断及光热治疗研究。**方法** 采用热解法制备 NaYF₄:Yb,Er/Tm 纳米粒子, 检测其表征及对细胞的毒性; 然后与 CD44v6 抗体耦联, 制备成可以检测 CD44v6⁺ 细胞的 UCNPs 探针; 用荧光显微镜观察 CD44v6 UCNPs 探针的靶向作用; 体外进行 CD44v6 UCNPs 对结直肠癌 CSC 光热治疗。**结果** UCNPs 对肿瘤细胞无毒性; 成功制备 CD44v6 UCNPs 探针; 实现体外结直肠癌 CSC 的靶向荧光成像和光热治疗。**结论** 成功制备靶向 UCNPs 探针并将其应用于结直肠癌 CSC 的荧光成像及光热治疗。

[关键词] CD44v6; 上转换; 结直肠肿瘤; 肿瘤干细胞; 光热治疗

[中图分类号] R73-36

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)08-1374-07

Targeted nanoprobes in fluorescent imaging and photothermal therapy of colorectal cancer stem cells*

CAO Yong¹, LYU Qiang², SUN Yingyan³, GAO Xiaohong^{4△}

(1. Department of Forensic Pathology, Zunyi Medical College, Guizhou 563099, China; 2. Medical Research Center, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China; 3. Department of Ultrasound, Hongqi Hospital, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China; 4. Laboratory of Biotechnology, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China)

[Abstract] **Objective** To prepare a functionalized up-conversion nano-probe (UCNPs) of CD44v6 for diagnosis and photothermal therapy of colorectal cancer stem cells. **Methods** Nanofibers NaYF₄:Yb,Er/Tm were prepared by pyrolysis method, and detection of its characterization and toxicity to cells were carried out. Then, UCNPs probes for CD44v6⁺ cells were prepared by coupling the UCNPs with CD44v6 antibody. Fluorescence microscopy was used to observe the target action of CD44v6 UCNPs. UCNPs were used to photothermal therapy of colorectal cancer stem cells in vitro. **Results** UCNPs were non-toxic to tumor cells. CD44v6 UCNPs were successfully prepared and targeted fluorescence imaging and photothermal therapy of colorectal cancer stem cells were achieved in vitro. **Conclusion** The targeted UCNPs were successfully prepared and applied to fluorescence imaging and photothermal therapy of colorectal cancer stem cells.

[Key words] CD44v6; up-conversion; colorectal neoplasms; neoplastic stem cells; photothermal therapy

肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)概念是 MACKILLOP 等^[1]于 1983 年提出, 认为 CSC 是维持肿瘤生长的核心, 是肿瘤发生侵袭转移的根源。LAPIDOT 等^[2]于 1994 年将急性髓性白血病中 CD34⁺CD38⁻的瘤细胞接种到非肥胖糖尿病/重症联合免疫(NOD/SCID)小鼠体内时能形成肿瘤, 进而证实 CSC 的存在。随后, 证实 CSC 是肿瘤组织内具有自我更新和异体种植成瘤能力的一小群细胞^[3-4], 如在乳腺癌、结肠癌等中均分离出 CSC^[2-4]。众多学者

认为肿瘤侵袭由少数具有特殊表型的细胞做诱发, 这些细胞具有与 CSC 相似的特性^[5-6]。目前, 诸多研究已证实 CD44 可以参与细胞间的信号传导, 并与肿瘤的生长、侵袭、转移及造血干细胞的归巢等密切相关。在胃癌、结肠癌、肝癌等中普遍存在 CD44v6 表达失控, CD44v6 高表达与肿瘤进展、转移及预后等过程有关^[7]。然而, 关于 CD44 在结直肠癌侵袭转移中的作用仍未明确。而上转换纳米粒子(up-conversion nanoparticles, UCNPs)具有生物安全性高、抗光漂白作用

强、发光稳定性好,且易与抗体相耦联等优点。因此,本实验拟构建 CD44v6 功能化 UCNP 探针,并将其应用于体外结直肠癌 CSC 的荧光成像及光热治疗,为结直肠癌的早期诊断及治疗提供一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 六水硝酸钇[$\text{Y}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]、六水硝酸镱[$\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]、六水硝酸铒[$\text{Er}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]、六水硝酸铥[$\text{Tm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]等(上海莎博化工科技有限公司),氟化钠(NaF)、环己烷(C_6H_{12})等(北京化学试剂公司),1-乙基-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、2-无水吗啉乙磺酸(MES)等(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),CD44v6 [NO: MCA1730,安诺伦(北京)生物科技有限公司],透射电子显微镜 JEM-1010(日本电子公司 JEOL),傅立叶红外光谱分析仪 Tensor 37(德国 Bruker Optics 公司),980 nm 激光器 STL980AIO3-20.0W(北京思通博远激光科技有限公司),倒置相差显微镜 TS100(日本 Nikon 公司),小动物活体成像系统 Berthold LB983 NC100(德国 Berthold Technologies 公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 UCNP 制备 制备 UCNP 时参考热解法合成^[8],对实验步骤修正改进。

1.2.1.1 铒镱共掺杂四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$)制备 称取 0.012 7 g 氧化铒(Er_2O_3)、0.118 0 g 氧化镱(Yb_2O_3)和 0.300 5 g 氧化钇(Y_2O_3),滴入稀盐酸加热至溶解,结晶后待用。将去离子水、无水乙醇和油酸各 10 mL 加入烧瓶中,磁力搅拌 10 min,将 0.394 3 g 氧化铵(NH_4F)和 0.106 4 g 氢氧化钠(NaOH)加入烧瓶搅拌 10 min;将混合物移到反应釜,180 °C 持续 720 min 后冷却至室温,将反应物经 4 000 r/min,离心 20 min,乙醇洗涤 3 次,70 °C 烘干备用。

1.2.1.2 铥镱共掺杂四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$)制备 将 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 制备中的 Er_2O_3 用 Tm_2O_3 替代,其余方法步骤同 1.2.1,即得 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ 。

1.2.2 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/Tm}$ 的表面修饰 配置 Lermieux-von Rudloff 氧化剂[去离子水 30 mL、偏高碘酸钠(NaIO_4)2.6 g、高锰酸钾(KMnO_4)0.036 g],称 0.2 g $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 用正己烷和乙醇超声 3 次,22 000 r/min 离心,向离心产物中加入 100 mL 环己烷、70 mL 叔丁醇、10 mL 去离子水和 5 mL 5% 的碳酸钠(Na_2CO_3),搅拌 20 min;向混合物加入 30 mL Lermieux-von Rudloff 氧化剂,将混合物于 40 °C 搅拌 24 h,将产物,22 000 r/min 离心 30 min,洗涤再离心上述产物;将产物分别分散在 50 mL (pH 4~5) 盐酸中,搅拌 30 min 后经 11 000 r/min,离心 30 min、70 °C 干燥备用。 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ 的表面修饰方法用 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 的表面修饰。

1.2.3 透射电镜 将待检测样品充分分散后取适量放置到铜网上压片检测,用电镜观察 UCNP 形貌及尺寸(加速电压 100 kV;点分辨率 0.24 nm)。

1.2.4 荧光分光光度计检测 将待测样品调制 10 mg/mL,室温下将样品用连续激发 980 nm 激光器的荧光光谱仪进行测定,扫描范围 200~800 nm;

1.2.5 傅立叶红外光谱仪检测 取干燥样品与溴化钾(KBr,1:100)研磨成细粉状,压片后置傅立叶红外光谱中分析颗粒表面的化学基团,扫描范围 250~4 000/cm。

1.2.6 结直肠癌细胞 DLD1 培养 将 DLD1 细胞置含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养瓶中,37 °C、5% CO_2 培养箱孵育。弃 DMEM 培养液[含青霉素钠 100 IU/L,链霉素 100 IU/L(pH 7.2~7.4)],加入 2~3 mL 0.25% 胰酶消化,待细胞变圆或细胞间隙增宽时,终止消化,收集细胞离心,弃胰酶消化液,加入新鲜 DMEM 培养液,制成细胞悬液,按 1:3 传代至培养瓶中。

1.2.7 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 UCNP 对 DLD1 细胞抑制率 取对数生长期的 DLD1 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化制备细胞悬液,96 孔板接种 DLD1 细胞 5.0×10^4 /孔,设阴性对照组及调零组,每孔加不同浓度的 UCNP($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 或 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ 0.50、100、200、400、800、1 600 $\mu\text{g/mL}$),每组设 7 个复孔,培养 24 h;加入 MTT(5 mg/mL)20 μL 后继续培养 4 h,弃培养基,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μL ,振荡 10 min,在酶标仪 570 nm 下检测吸光度(OD)值(用 630 nm 校准);计算 UCNP 对细胞抑制率,本实验重复 3 次;细胞抑制率 = $1 - \text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值} \times 100\%$ 。 $\text{NaYF}_4:\text{Tm}$ 对 DLD1 细胞抑制率检测方法同 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 的检测方法。

1.2.8 制备 CD44v6 UCNP 探针 取氧化的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 10 mg 分别加入 MES 缓冲液洗涤后离心,加 7 mL MES 缓冲液、5 mg EDC、15 mg NHS,磁力搅拌器反应 1 h;将产物用 PBS 洗涤,11 000 r/min 离心 30 min;将产物放入 3 mL PBS 经 0.22 μm 过滤器滤过后,加入 10 μL CD44v6 单克隆抗体,室温反应 2 h,既得 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er-CD44v6}$ 探针,4 °C 保存备用。 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm-CD44v6}$ 探针制备方法同 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er-CD44v6}$ 。

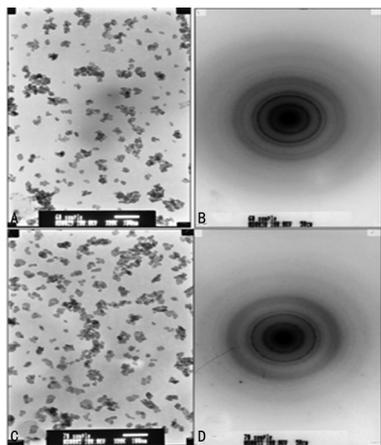
1.2.9 DLD1 干细胞光热治疗 利用 980nm 激光器激发结合 CD44v6 UCNP 探针对结直肠癌 CSC 进行光热治疗。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件分析数据,各实验组与对照组细胞抑制率比较采用方差分析(Analysis of Variance),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/Tm}$ 的表征 透射电镜对

NaYF₄:Yb,Er 和 NaYF₄:Yb,Tm 进行形貌、晶体结构表征观察,结果显示,两种 UCNP 经谢勒公式计算,粒子直径 20~35 nm,均为六角相的 UCNP,图 1A、C 图示两种 UCNP 均有良好分散性,图 1B、D 示两种 UCNP 在受到电子束激发时均具有同心圆环组成的选区多晶电子衍射图样。



A: NaYF₄:Yb,Er 图像; B: NaYF₄:Yb,Er 电子衍射图; C: NaYF₄:Yb,Tm 图像; D: NaYF₄:Yb,Tm 电子衍射图

图 1 透射电镜对 NaYF₄:Yb,Er/Tm 进行表征观察

2.2 荧光分光光度计检测 荧光光谱测定采用 980 nm 近红外连续激光器为激发光源,其激发狭缝为 5 nm,Er³⁺、Tm³⁺ 两种激活离子的能级均比较丰富,其电子亚稳态较多,电子可以发生跃迁的种类较多,因此得到 UCNP 的发射峰较多。从图 2~4 结果提示: NaYF₄:Yb,Er 具有 3 个发射特征的发射峰,分别位于 525、543、659 nm,其发射峰分别对应 Er³⁺ 离子的 ²H_{11/2} → ⁴I_{15/2}, ⁴S_{3/2} → ⁴I_{15/2}, ⁴F_{9/2} → ⁴I_{15/2} 的电子跃迁; NaYF₄:Yb,Tm 也具有 3 个发射特征的发射峰,分别位于 361、451、475 nm,其发射峰分别对应 Tm³⁺ 离子的 ¹D₂ → ³H₆, ¹G₄ → ³H₆ 的电子跃迁。

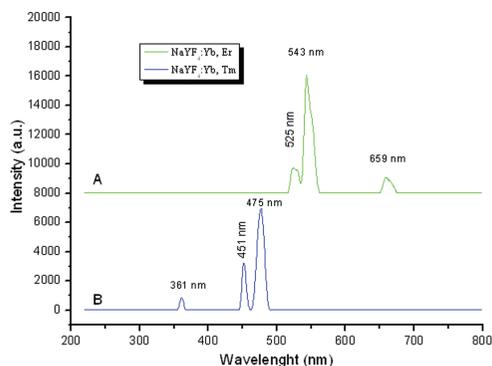


图 2 NaYF₄:Yb,Er/Tm 上转换发光光谱图

2.3 NaYF₄:Yb,Er/Tm 表面修饰后表征 傅立叶红外光谱检测修饰前、后的 NaYF₄:Yb,Er/Tm。结果如图 5~6 示,图 5、6 中黑色线分别代表 NaYF₄:Yb,Er/Tm 氧化前的振动光谱,图 5 绿色线代表 NaYF₄:Yb,Er 氧化后的振动光谱,图 6 蓝色线代表 NaYF₄:Yb,Tm 氧化后的振动光谱,均在 ~1 640/cm

处发现羧基(-COH)基团的伸缩振动谱,而在 ~3 417/cm 处表现出宽频带吸收峰,对应羟基(-OH)基团的伸缩振动谱,UCNP 氧化后的振动谱比氧化前明显增强,证实 NaYF₄:Yb,Er/Tm 氧化后 -COOH 的存在,表明 NaYF₄:Yb,Er/Tm 修饰成功。

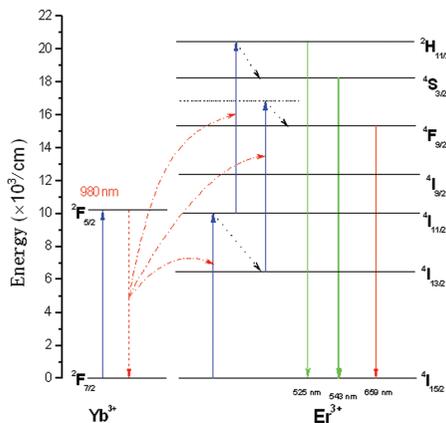


图 3 NaYF₄:Yb,Er 上转换发光机制

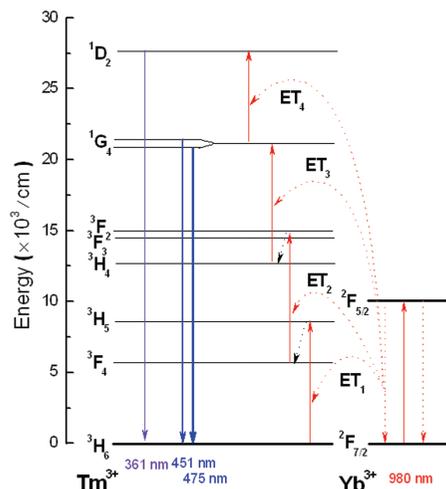
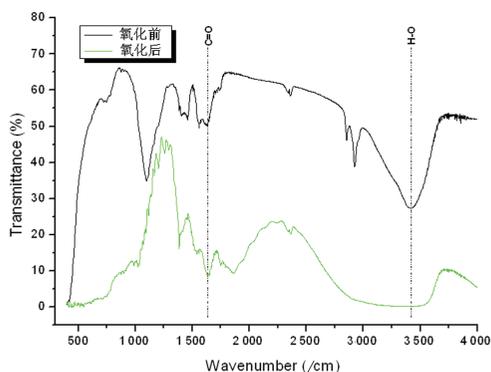


图 4 NaYF₄:Yb,Tm 上转换发光机制

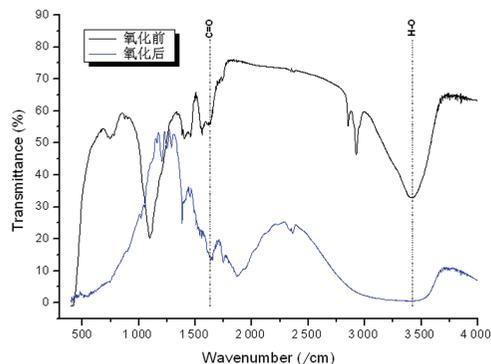


黑色线: NaYF₄:Yb,Er 氧化前振动光谱,绿色线: NaYF₄:Yb,Er 氧化后振动光谱

图 5 NaYF₄:Yb,Er 氧化前后红外光谱

2.4 MTT 检测 2 种 UCNP 对 DLD1 细胞抑制率 NaYF₄:Yb,Er(表 1)和 NaYF₄:Yb,Tm(表 2)细胞毒性分析结果显示,1 600 μg/mL 高浓度组细胞抑制率与阴性对照组(0 μg/mL)比较差异有统计学意义(NaYF₄:Yb,Er, P = 0.003; NaYF₄:Yb,Tm, P =

0.000), 其余各组与阴性对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 实验时采用中剂量浓度组 ($400 \mu\text{g}/\text{mL}$), 所合成的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/Tm}$ 在实验过程中对肿瘤细胞无毒性。



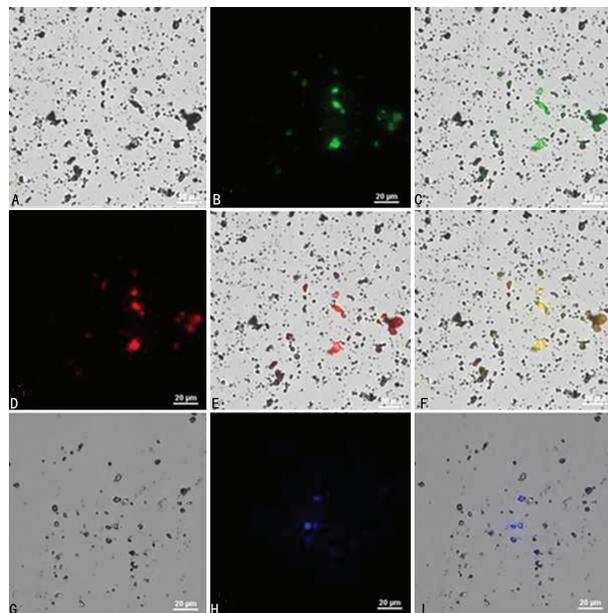
黑色线: $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}$ 氧化前振动光谱, 蓝色线: $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}$ 氧化后振动光谱

图 6 $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}$ 氧化前后红外光谱

2.5 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/Tm}$ 荧光成像 用 980 nm 激光器分别对 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}$ 进行 2 W/10 s 连续红外光激发, 分别获取粒子的明、暗场图像和荧光像, 并对图像进行合并, 以证明上转换得到的红、绿色荧光像和蓝色荧光像是纳米粒子本身受到激发所得。结果显示(图 7): 采用 980 nm 连续激发取样拍照。从图 7F 中清晰得到 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 红、绿两种荧光, 从成像图中可证实合成的纳米粒子具有良好的发光性, 且发光不受时间限制。

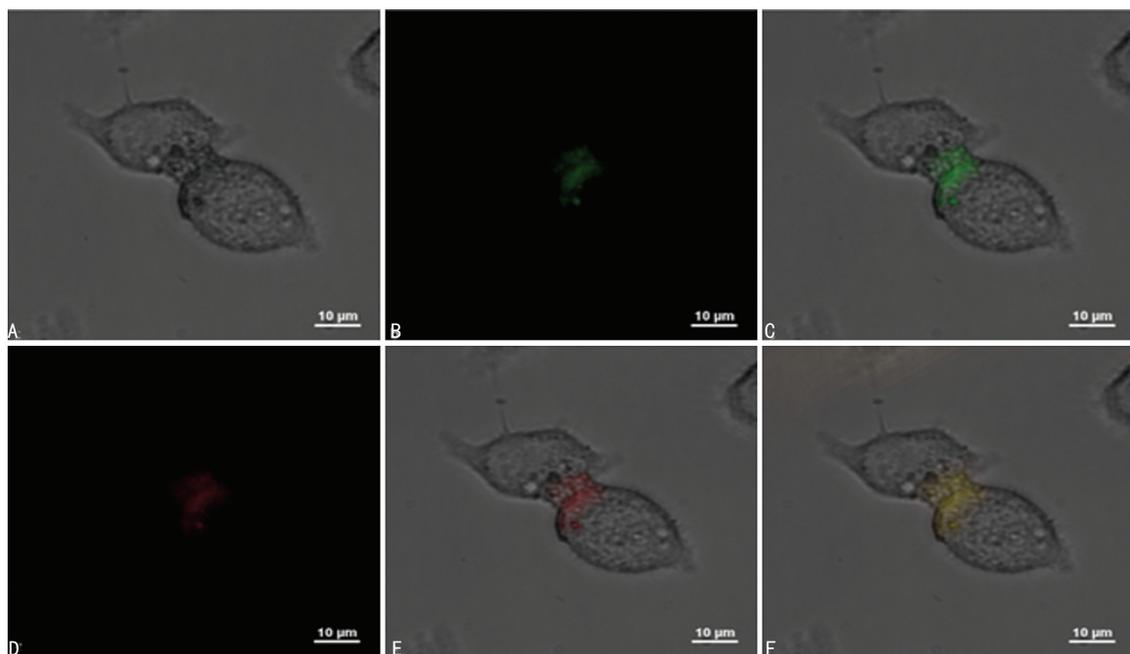
2.6 CD44v6 UCNP 探针靶向 DLD1 CSC 荧光成像 12 孔培养板每孔加入 $500 \mu\text{L}$ CD44v6 UCNP 探针, 置 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养 2 h, 弃上清液, 加 $1000 \mu\text{L}$ PBS。DLD1 细胞与探针共孵育后用 PBS

代替 DMEM 培养基以减少培养基中颜色对 980 nm 激光的影响。CD44v6- $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 探针上转换成像结果(图 8)示: CD44v6 表达于细胞膜, 尤其处于分裂晚期的细胞之间蛋白表达量明显增多, CD44v6 蛋白表达符合干细胞不对称分裂特性。CD44v6- $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}$ 探针上转换成像图(图 9)中可见荧光成像在肿瘤细胞表面呈簇状分布或呈点状分布, 提示肿瘤细胞成像时对于发光较弱的荧光信号可以加大激发功率或延迟激发时间以便得到清晰图像。



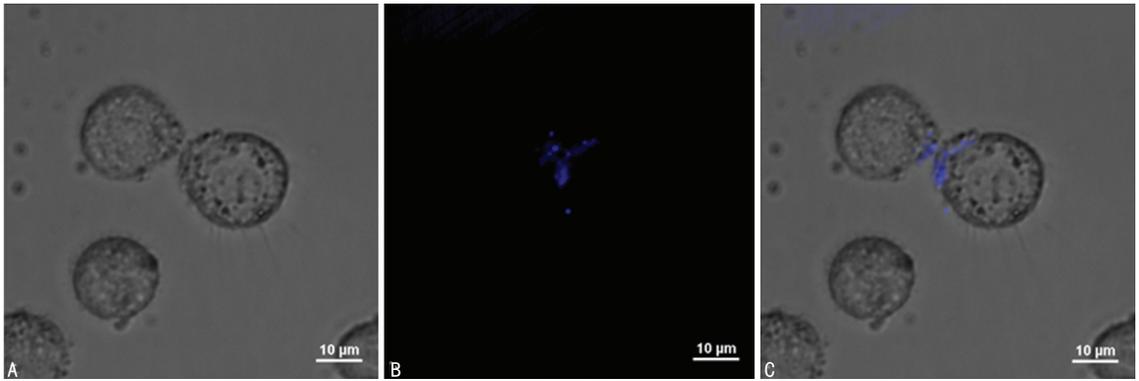
A: $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 明场像; B: 绿色荧光暗场像; C: A、B 明场与暗场合并像; D: 红色荧光暗场图; E: A、D 明场与暗场合并像; F: $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 明、暗场、红绿色荧光合并像; G: $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}$ 明场像; H: 蓝色荧光暗场像; I: G、H 明、暗场合并像

图 7 UCNP 上转换成像图



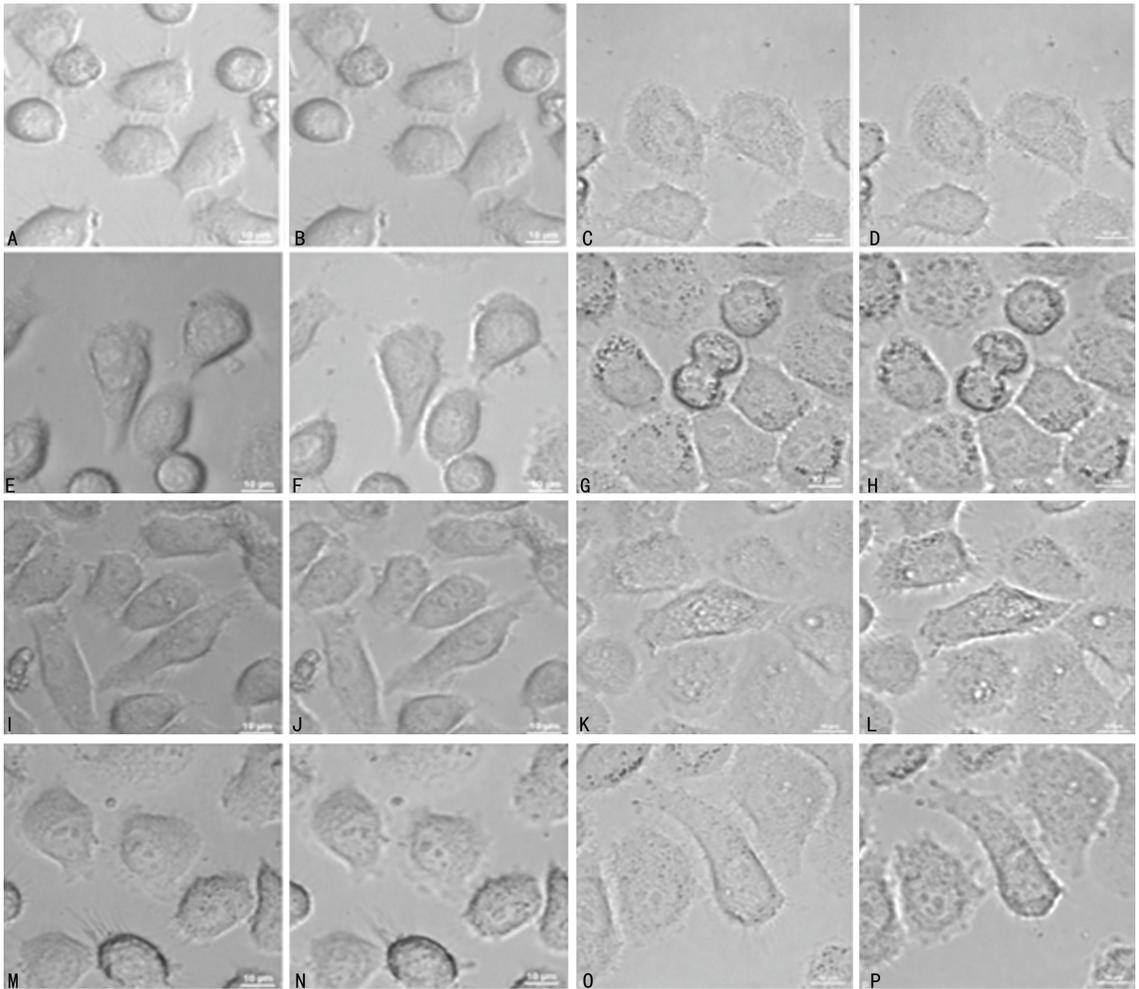
A: 明场像; B: 绿色荧光暗场像; C: A、B 明暗场合并像; D: 红色荧光暗场像; E: A、D 明暗场合并像; F: 红、绿色荧光合并成黄色荧光像

图 8 CD44v6- $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 上转换荧光成像



A: 明场像; B: 蓝色荧光暗场像; C: 明暗场合并像

图 9 CD44v6-NaYF₄:Yb,Tm 上转换荧光成像

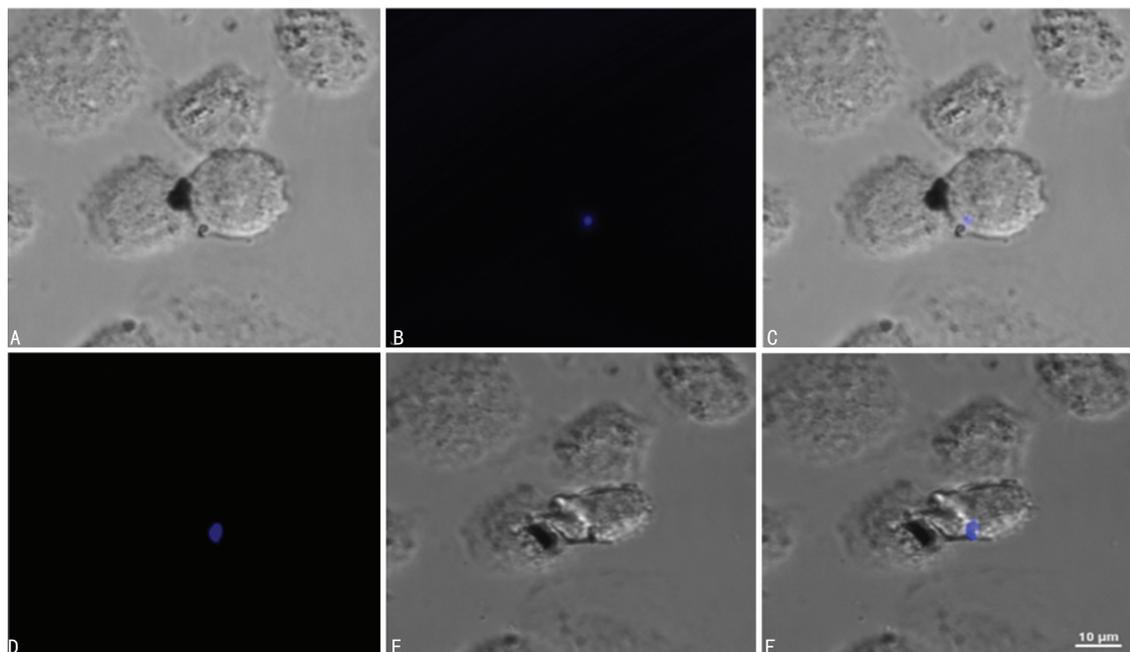


A,B:1 W/50 s;C,D:2 W/50 s;E,F:3 W/50 s;G,H:4 W/50 s;I,J:5 W/50 s;K,L:6 W/50 s;M,N:7 W/50 s;O,P:8 W/50 s

图 10 肿瘤细胞光热治疗

2.7 DLD1 CSC 的靶向光热治疗 鉴于蓝色荧光转换为热效率高的特点,本实验选择被激发后发蓝光的 CD44v6-NaYF₄:Yb,Tm 探针,以不同功率不同时间的 980 nm 连续激发后,明确蓝光转换为热能对细胞损伤的阈值,如图 10A~F 示经 1~3 W/50 s 980 nm 激发后细胞形态未见明显异常;图 10G、H 图显示 4 W/50 s 980 nm 连续激发细胞后可见分裂末期两个子细胞连接处明显萎缩;图 10I、J 和图 10K、L 分别经 5、6 W/50 s 激发后部分细胞萎缩,包括细胞膜皱

缩,细胞体积变小;图 10M、N 示经 7 W/50 s 激发后细胞核核仁皱缩成团块状凝集,部分细胞核仁呈块状分布;图 10O、P 示经 8 W/50 s 激发后细胞膜边缘皱缩部分呈肉芽状突起、破碎,细胞质内细胞器凝聚、蛋白质凝聚,细胞核部分核仁皱缩成团块状凝集。经上述不同功率 980 nm 激发照射,肿瘤细胞膜、细胞核等发生不同程度形态学变化。结果显示:DLD1 细胞在受到近红外 980 nm 激发不超过 3 W/50 s 时,DLD1 细胞不会受到明显影响,因此,后续细胞光热治疗以 4 W/50 s



A: 明场像; B: 暗场像; C: 明暗场合并像; D: 4 W/50 s 荧光暗场像; E: 4 W/50 s 连续激发后明场像; F: 治疗前、后合并像显示细胞体积明显固缩

图 11 CD44v6-NaYF₄:Yb,Tm 光热损伤成像图

作为治疗阈值。

以 980 nm、4 W/50 s 激发特异性结合的纳米探针 (CD44v6-NaYF₄:Yb,Tm 对 DLD1 细胞进行光热治疗时), 结果如图 11 中可见, 肿瘤细胞在经 980 nm、4 W/50 s 连续激发后其细胞体积明显固缩, 细胞膜明显皱缩、破坏等病理形态改变。

表 1 NaYF₄:Yb,Er 对肿瘤细胞抑制率

NaYF ₄ :Yb,Er 浓度(μg/mL)	OD 值	标准差	增值率	抑制率
0	1.480 4	0.012 6	1	0
50	1.451 3	0.028 9	0.980 3	0.019 7
100	1.448 7	0.026 5	0.978 6	0.021 4
200	1.443 8	0.040 8	0.968 5	0.031 5
400	1.421 0	0.075 4	0.959 9	0.040 1
800	1.415 7	0.034 6	0.956 3	0.043 7
1 600	1.394 3	0.049 4	0.941 8	0.058 2

表 2 NaYF₄:Yb,Tm 对肿瘤细胞抑制率

NaYF ₄ :Yb,Tm 浓度(μg/mL)	OD 值	标准差	增值率	抑制率
0	1.338 1	0.021 7	1	0
50	1.333 2	0.022 2	0.996 3	0.003 7
100	1.324 7	0.016 0	0.997 4	0.002 6
200	1.315 7	0.005 5	0.983 2	0.016 8
400	1.314 5	0.004 6	0.982 3	0.017 7
800	1.313 5	0.002 9	0.981 5	0.018 5
1 600	1.297 0	0.011 0	0.969 2	0.030 8

3 讨 论

结直肠癌确诊需术后病理切片证实, 发现时多数已进入中晚期, 目前, 结直肠癌治疗仍以手术和化学

药物治疗为主, 但常规化学药物因无抗肿瘤细胞的特异靶向性, 其在杀伤肿瘤细胞的同时也对正常组织细胞产生损伤, 并且易引起肿瘤细胞的耐药性。随着对 CSC 的深入研究发现, CSC 决定了肿瘤的复发和侵袭转移, 同时肿瘤的耐药性也取决于 CSC 的耐药性^[9-10]。因此, 针对 CSC 的靶向治疗可能是有效的肿瘤治疗方案之一。目前, 已有研究证实在多种恶性肿瘤如胃癌、结肠癌、肝癌等普遍存在 CD44v6 表达失控, CD44v6 高表达与肿瘤侵袭、转移及预后等密切相关^[7], 另外, TODARO 等^[11] 在 2014 年发现 CD44v6 既可能是一个生物标记物也可能是结直肠癌 CSC 治疗性靶点之一。

基于以上研究, 本实验制备 NaYF₄:Yb,Tm UC-NPs, 经 NHS/EDC 偶联 CD44v6 抗体的靶向探针, 以期达到靶向结直肠癌 CSC 目的, 并经分子成像技术实现对结直肠癌 CSC 的影像诊断及靶向光热治疗的作用鉴别, 从而提高肿瘤治疗效果。实验结果显示, 制备 UC-NPs 直径为 20~35 nm, 粒径均匀; 经傅立叶红外光谱检测 UC-NPs 修饰成功, 具有良好的生物相容性及水溶液分散性; MTT 检测说明 UC-NPs 实验用量对 DLD1 细胞无毒性。通过体外实验证实, 该纳米探针对 CD44v6⁺ 的结直肠癌 CSC 有良好的靶向性, 可实现上转换荧光的实时成像, 避免了生物发光成像中如荧光素酶半衰期的限制。关于 UC-NPs 经 980 nm 激光器激发后是否对细胞本身造成影响报道并不多见, SHEN 等^[12] 报道 HeLa 细胞在接受近红外激光获得的辐射前、后显微镜图像的对比图发现, 其细胞形态并没有明显差异。而高温杀伤肿瘤细胞的具体作用机制目前仍未完全明确, 一般认为有多种作用机制: 高温能够破坏细胞核, 尤其当温度超过 41 °C 时,

细胞核、染色质可凝集成团块,使蛋白质凝固变性,最终导致细胞死亡,并产生新的溶酶体使细胞发生自身溶解^[13],而激光作用于生物组织后,可以引起各种物理化学效应,因此使用激光治疗各种疾病已被广泛应用^[14-15]。目前,针对肿瘤细胞热治疗多数研究的重点是光动力学治疗^[16],但采用 UCNP 本身作为直接热杀伤肿瘤细胞的研究未见报道,因此本研究主要针对 UCNP 本身在受到不同时间、不同功率 980 nm 激发后其局部的产热作用,以达到杀伤结直肠癌 CSC 的目的,其研究结果显示:DLD1 CSC 经 980 nm、4 W/50 s 连续激发后其细胞体积明显缩小,部分细胞核呈团块状凝集、固缩,细胞膜皱缩等病理改变,此研究结果表明 UCNP 可在 980nm 激发后具有直接杀死肿瘤 CSC 的作用。

综上所述,通过使用靶向纳米探针,可实现对肿瘤 CSC 的实时无创性影像学诊断,又可实现对其靶向精准光热治疗,从而达到在杀死 CSC 的同时又达到了常规化学药物不能达到的治疗效果;同时,靶向纳米探针可避免 CSC 耐药性的产生,进而提高常规化学药物对一般肿瘤细胞的治疗效果。因此,UCNP 探针是一种具有良好应用前景的治疗方案之一。本实验下一阶段将进一步探讨 UCNP 探针在体内对肿瘤的荧光成像及光热治疗作用,以及靶向纳米载药体系的构建和应用。

参考文献

- [1] MACKILLOP W J, CIAMPI A, TILL J E, et al. A stem cell model of human tumor growth; implications for tumor cell clonogenic assays[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1983, 70(1):9-16.
- [2] LAPIDOT T, SIRARD C, VORMOOR J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice[J]. *Nature*, 1994, 367(6464):645-648.
- [3] KENNEDY J A, BARABÉ F, POEPL A G, et al. Comment on "tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells"[J]. *Science*, 2007, 318(5857):1722-1722.
- [4] CLARKE M F, DICK J E, DIRKS P B, et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(19):9339-9344.
- [5] CROKER A K, ALLAN A L. Cancer stem cells; implications for the progression and treatment of metastatic disease[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(2):374-390.
- [6] CIVENNI G, SOMMER L. Chemokines in neuroectodermal development and their potential implication in cancer stem cell-driven metastasis[J]. *Semin Cancer Biol*, 2009, 19(2):68-75.
- [7] MISRA S, GHATAK S, PATIL N, et al. Novel dual cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors targeting hyaluronan-CD44v6 pathway and inducing cytotoxicity in colon cancer cells[J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(9):2551-2559.
- [8] CHEN Z G, CHEN H L, HU H, et al. Versatile synthesis strategy for carboxylic acid-functionalized upconverting nanophosphors as biological labels[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(10):3023-3029.
- [9] CHIBA T, KITA K, ZHENG Y W, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties[J]. *Hepatology*, 2006, 44(1):240-251.
- [10] PHESSÉ T J, CLARKE A R. Normal stem cells in cancer prone epithelial tissues[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(2):221-227.
- [11] TODARO M, GAGGIANESI M, CATALANO V, et al. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3):342-356.
- [12] SHEN J, CHEN G, OHULCHANSKY T Y, et al. Tunable near infrared to ultraviolet upconversion luminescence enhancement in (α -NaYF₄:Yb, Tm)/CaF₂ core/shell nanoparticles for in situ real-time recorded biocompatible photoactivation[J]. *Small*, 2013, 9(19):3213-3217.
- [13] BARNI S, BERTONE V, SILOTTI M G, et al. Lysosomal exocytosis induced by hyperthermia; a new model of cancer death. III. Effect on liver metastasis[J]. *Biomed Pharmacother*, 1996, 50(2):79-84.
- [14] 李赓韬, 钱志余, 李婷. 组织热凝固程度无损监控的光学断层成像研究[J]. *光学学报*, 2010, 20(1):169-174.
- [15] 张先增, 王晓燕, 詹振林, 等. 脉冲 CO₂ 激光与 Er:YAG 激光颅骨组织消融的比较[J]. *中国激光*, 2009, 36(10):2577-2581.
- [16] ZHOU A, WEI Y, WU B, et al. Pyropheophorbide a and c (RGDyK) comodified Chitosan-wrapped upconversion nanoparticle for targeted near-infrared photodynamic therapy[J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(6):1580-1589.

(收稿日期:2018-12-22 修回日期:2019-01-21)