



DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.002

## · 基础研究 ·

## 负载 MnO<sub>2</sub>纳米颗粒的可得然复合水凝胶的构建及其联合光热疗法对黑色素瘤 B16-F10 细胞的杀伤效果

张停琳<sup>1a△</sup>, 吴丽丽<sup>1a△</sup>, 王雨<sup>2</sup>, 张转转<sup>3</sup>, 周旋<sup>4</sup>, 李美桂<sup>4</sup>, 严珍珍<sup>1b</sup>, 丁秀文<sup>1a</sup>, 陆松伟<sup>1c</sup>, 陈翠敏<sup>1a</sup>, 梁浩<sup>1a</sup>, 张梦亚<sup>1a</sup>, 高洁<sup>1a,3,4</sup>(1. 海军军医大学长海医院 a. 临床研究中心; b. 烧伤外科; c. 药学部, 上海 200433; 2. 复旦大学附属金山医院 骨科, 上海 200540; 3. 上海大学 转化医学研究院, 上海 200040; 4. 河南大学 药学院, 河南 郑州 475004)

**[摘要]** 目的: 构建负载二氧化锰(MnO<sub>2</sub>)纳米颗粒的可得然(Cur)复合水凝胶 MnO<sub>2</sub>@Cur(简称 MGel), 研究其对黑色素瘤 B16-F10 细胞的杀伤效果。方法: 采用热诱导法制备 Cur 水凝胶(Gel), 物理负载 MnO<sub>2</sub> 构建 MGel, 表征其宏观和微观形貌, 检测其机械性能、降解性能以及光热转换性能等理化性能, 并研究其联合 PTT 对小鼠皮肤黑色素瘤 B16-F10 细胞的光热杀伤效果。结果: MGel 具有优异的机械和可降解性能, 抗拉伸强度达(127.97±3.60)kPa、抗压缩强度达(151.44±5.23)kPa, 28 d 降解率约 58.17%。MGel 负载 MnO<sub>2</sub> 纳米片(粒径约 180 nm)获得优异的光热转换性能, 负载 1.0 mg/mL MnO<sub>2</sub> 的 MGel 在 1.0 W/cm<sup>2</sup> 的 808 nm NIR 光照 4 min 后到达最高温度 50 °C。细胞毒性实验和 Calcein-AM/PI 荧光双染色实验表明, MGel 联合 PTT 有效杀伤 B16-F10 黑色素瘤细胞, NIR 光照使得 MGel 组细胞存活率降低至(4.68±0.66)%(P<0.000 1)。结论: MGel 复合水凝胶具备优异的机械性能、可降解性能以及光热转换性能, 其联合 PTT 能有效杀伤肿瘤细胞, 可能成为一种有效治疗黑色素瘤的新手段。

**[关键词]** 黑色素瘤; B16-F10 细胞; 光热治疗; 二氧化锰; 可得然胶; 复合水凝胶

**[中图分类号]** R879.1; R730.54; R739.5   **[文献标识码]** A   **[文章编号]** 1007-385x(2023)08-0656-09

## Construction of a MnO<sub>2</sub>/Crudlan composite hydrogel and its killing effect on melanoma B16-F10 cells combined with photothermal therapy

ZHANG Tinglin<sup>1a△</sup>, WU Lili<sup>1a△</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>, ZHANG Zhuanzhuan<sup>3</sup>, ZHOU Xuan<sup>4</sup>, LI Meigui<sup>4</sup>, YAN Zhenzhen<sup>1b</sup>, DING Xiuwen<sup>1a</sup>, LU Songwei<sup>1c</sup>, CHEN Cuimin<sup>1a</sup>, LIANG Hao<sup>1a</sup>, ZHANG Mengya<sup>1a</sup>, GAO Jie<sup>1a,3,4</sup> (1. a. Clinical Research Unit; b. Department of Burn Surgery; c. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Orthopedics, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200540, China; 3. Institute of Translational Medicine, Shanghai University, Shanghai 200040, China; 4. College of Pharmacy, Henan University, Zhengzhou 475004, Henan, China)

**[Abstract]** Objective: Crudlan (Cur) was loaded with manganese dioxide (MnO<sub>2</sub>) nanoparticle to construct a composite hydrogel MnO<sub>2</sub>@Cur (abbreviated as MGel) and its killing effect on melanoma B16-F10 cells was studied. Methods: Firstly, Cur hydrogel (Gel) was prepared by thermal induction method, and then MnO<sub>2</sub> was physically loaded to construct MGel. The macroscopic and microscopic morphology of MGel was characterized and its mechanical properties, degradation properties and photothermal conversion properties were detected. The photothermal killing effect of MGel combined with PTT on mouse cutaneous melanoma B16-F10 cells was studied. Results: MGel is excellent in mechanical strength and degradation performance. Its tensile strength reached (127.97±3.60) kPa, and compressive strength reached (151.44±5.23) kPa; its degradation rate on the 28th day was about 58.17%. MGel obtained excellent photothermal conversion capability after loading MnO<sub>2</sub> nanosheets with the average particle diameter of about 180 nm. After receiving 808 nm NIR illumination at 1.0 W/cm<sup>2</sup> for 4 minutes, MGel loaded with 1.0 mg/mL MnO<sub>2</sub> reached a maximum temperature of 50 °C. Cytotoxicity experiments and Calcein-AM/PI fluorescence double staining showed that MGel combined with PTT killed B16-F10 melanoma cells effectively, and NIR illumination reduced the cell survival rate of the MGel group to (4.68±0.66)%(P<0.000 1). Conclusion: Composite hydrogel MGel has excellent mechanical strength, degradation performance and photothermal conversion

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 82072051)

**[作者简介]** 张停琳(1996—), 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事实体瘤术后复发治疗和组织修复仿生支架材料的研究, E-mail: ztl2107@smmu.edu.cn; 吴丽丽(1985—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事实体瘤术后复发治疗和组织修复仿生支架材料的研究, E-mail: lilywu@smmu.edu.cn。△为共同第一作者。

**[通信作者]** 高洁, E-mail: gaojiehighclea@smmu.edu.cn; 张梦亚, E-mail: zhangmengya@smmu.edu.cn。



capability. MGel combined with PTT can kill tumor cells effectively, which provides a novel strategy for the treatment of melanoma.

[Key words] melanoma; B16-F10 cell; photothermal therapy (PTT); manganese dioxide (MnO<sub>2</sub>); curdlan (Cur); composite hydrogel

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(8): 656-664. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.002]

黑色素瘤是源自黑色素细胞的恶性肿瘤,具有转移倾向高和病死率高的特点。对其治疗的传统手段主要有手术切除,辅以放疗、化学、靶向治疗以及免疫治疗,但均存在术后愈合难、辅助治疗不良反应大和病灶处药物蓄积量低等问题<sup>[1-2]</sup>。光热治疗(photothermal therapy, PTT)是指通过特定光源照射升温以达治疗目的的新型治疗手段。与传统手段相比, PTT 具有光源穿透和光照区域可控的特点,可实现定点治疗,能显著降低传统疗法的不良反应<sup>[3-5]</sup>。二氧化锰(MnO<sub>2</sub>)是一种多功能抗肿瘤纳米载体,已被开发用作 PTT 光热剂;然而,MnO<sub>2</sub> 存在全身暴露、快速被清除、过早降解和病灶蓄积低等问题,影响 PTT 效果<sup>[6-8]</sup>。水凝胶是一种三维网状高分子材料,凭借优异的药物递送、生物相容和可降解性能,被广泛应用于肿瘤治疗领域。原位注射水凝胶可有效增加药物的病灶蓄积,最大限度减少药物向邻近组织的渗漏,从而提高治疗效果<sup>[9-16]</sup>。可得然(curdlan, Cur)是由  $\beta$ -(1,3)-d 糖苷键连接而成的三螺旋葡聚糖,兼具诸多生物活性和热致凝胶性,可开发为生物医用水凝胶材料<sup>[17-19]</sup>。本研究构建一种具备优异光热转换、机械和可降解性能的负载 MnO<sub>2</sub> 纳米颗粒的 Cur 复合水凝胶 MnO<sub>2</sub>@Cur(简称 MGel),用于介导 PTT 治疗黑色素瘤,拟解决传统治疗手段和纳米载体递送的诸多问题,为黑色素瘤治疗提供新手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、主要试剂及仪器

小鼠皮肤黑色素瘤 B16-F10 细胞购自上海葵赛生物科技有限公司,CCK-8 细胞增殖检测试剂盒(货号:C0038)和 Calcein-AM/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒(货号:C2015M)均购自上海碧云天生物技术有限公司。Cur(货号:CLC-C, 规格 200 g, 纯度≥97%), 购自泰兴东圣生物科技有限公司, MnO<sub>2</sub>(货号:BD137166, 规格 25 g, 纯度≥93%)购自上海毕得医药科技有限公司。

FEI Tecnai F20 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)、Thermo Kalpha X 射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)、Thermo Scientific 二氧化碳培养箱以及 Thermo Fisher Multiskan FC 酶标仪均购自赛默飞世尔科技公司,Zetasizer Lab 马尔文纳米粒度及电位分析仪和 X' Pert PRO MPD X 射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD)均购自马尔文帕纳科公司, Zeiss Sigma 300 扫

描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)购自德国蔡司公司,HAAKE MARS60 流变仪购自德国哈克公司,CMT6103 微机控制电子万能试验机购自上海恒驭仪器有限公司,FC-808-5000-MM 光纤输出激光系统购自上海熙隆光电科技有限公司,FOTRIC 320Pro 红外热像仪购自上海热像科技股份有限公司,徕卡 DM IL LED 荧光显微镜购自德国徕卡仪器有限公司,ME204 电子天平购自梅特勒托利多科技有限公司。

### 1.2 MGel 的制备方法

#### 1.2.1 Gel 的制备

研究表明<sup>[19]</sup>, Cur 具有独特的热致凝胶性, 高温(≥80 °C)加热其水悬液可直接形成高强度水凝胶, 低温(55~80 °C)加热后再降温可形成低强度水凝胶, 无需添加任何交联剂, 只需通过温度的调控, 便能实现不同强度 Cur 水凝胶的可控制备。本研究采用 65 °C 热诱导法制备 Gel: 65 °C 升温诱导水合作用, 37 °C 降温诱导氢键作用, 形成物理网络 Gel。

首先, 配制多种质量浓度(10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0 mg/mL)Cur 水悬液, 置于 65 °C 恒温水浴中加热 10 min, 样品呈均匀溶胶状; 然后, 转移至 37 °C 恒温环境, 静置降温 10 min, 样品呈凝胶状。

#### 1.2.2 MGel 的制备

基于热诱导法并辅以超声分散法<sup>[20]</sup>物理负载 MnO<sub>2</sub> 制备 MGel。首先, 配制多种质量浓度(2.5、5.0、7.5 mg/mL)MnO<sub>2</sub> 水悬液, 超声分散 30 min; 同时, 配制 62.5 mg/mL Cur 水悬液, 40 °C 恒温水浴加热搅拌 5 min, 样品呈均匀溶胶状; 然后, 按照 MnO<sub>2</sub>:Cur=1:4 体积比, 将 MnO<sub>2</sub> 水悬液加至 Cur 溶胶, 继续加热搅拌 5 min, 得到均匀的 MnO<sub>2</sub>@Cur 溶胶。其中, Cur 浓度为 50 mg/mL, MnO<sub>2</sub> 浓度分别为 0.5、1.0、1.5 mg/mL; 之后, 停止搅拌, 升温至 65 °C, 恒温水浴加热 10 min; 最后, 置于 37 °C 恒温环境, 降温 10 min, 获取凝胶状 MnO<sub>2</sub>@Cur, 即成功制备 MGel。

### 1.3 MGel 的理化特性表征

#### 1.3.1 MnO<sub>2</sub> 的表征

根据 MnO<sub>2</sub> 用作 PTT 光热剂的研究方法<sup>[20-21]</sup>对其进行表征, 采用 TEM 观察 MnO<sub>2</sub> 的微观形貌, 采用马尔文纳米粒度仪测定粒径分布, 采用 XPS 分析表面元素和化学状态, 采用 XRD 分析晶体结构。

#### 1.3.2 Gel 和 MGel 的表征

根据水凝胶用于黑色素瘤等皮肤创面治疗的研究方法<sup>[20-23]</sup>对其进行表征, 采用斜置瓶法观察样品状

态,研究凝胶性;采用SEM观察微观形貌,进行元素分析;采用流变仪测试储能模量G'和损耗模量G'';采用电子万能试验机测试拉伸和压缩力学性能;采用重量法测试在PBS(pH=7.4)环境中的溶胀和降解性能:溶胀率=(溶胀后的质量-溶胀前的质量)/溶胀前的质量×100%;失重率=降解后的质量/降解前的质量×100%;降解率=(降解前的质量-降解后的质量)/降解前的质量×100%。

#### 1.4 MGel光热转换性能的检测

根据水凝胶介导PTT的研究进行光热转换实验<sup>[24]</sup>,采用808 nm近红外二区(near-infrared second region,NIR-II)激光照射样品,同时以红外热像仪实时记录温度变化,观察MnO<sub>2</sub>质量浓度和NIR仪器功率对水凝胶光热转换性能的影响。分别在1.5 mL离心管内制备负载不同质量浓度(0、0.5、1.0、1.5 mg/mL)MnO<sub>2</sub>的MGel(0.5 mL),采用1 W/cm<sup>2</sup>的808 nm NIR光照5 min,同时采用红外热像仪每隔30 s记录一次温度和红外热图像,分析MnO<sub>2</sub>质量浓度对MGel光热性能的影响;采用不同功率(0、0.5、1.0、1.5 W/cm<sup>2</sup>)的NIR光照负载1 mg/mL MnO<sub>2</sub>的MGel,测试NIR仪器功率对MGel光热转换性能的影响;另外,采用1 W/cm<sup>2</sup>的NIR循环光照负载1 mg/mL MnO<sub>2</sub>的MGel,检测其光热转换能力稳定性。

#### 1.5 Gel和MGel对黑色素瘤B16-F10细胞的影响

##### 1.5.1 B16-F10细胞培养

参照文献[25]中方法,将B16-F10细胞置于含10%胎牛血清(FBS)、1%青霉素和1%链霉素的DMEM高糖完全培养基中,在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱内进行培养,待其汇合度达80%~95%时,按照标准比例(1:3)进行细胞传代操作。

##### 1.5.2 Gel和MGel浸提液的制备

参照文献[26]中方法制备水凝胶浸提液。首先,将Gel和MGel分别加入不含FBS和抗生素的DMEM培养基,置于37 °C恒温摇床中振摇48 h,制备成500 mg/mL的浸提液;然后,使用含有FBS和抗生素的DMEM完全培养基进行比例稀释,制备25、50、100、200 mg/mL MGel的浸提液。

##### 1.5.3 CCK-8法检测Gel和MGel浸提液对B16-F10细胞增殖的影响

首先,取对数生长期的B16-F10细胞进行消化和计数,取100 μL(1×10<sup>5</sup>个细胞/mL)的单细胞悬液接种于96孔板,培养12 h后弃培养基并用PBS洗涤2次;然后,分别加入不同质量浓度的Gel和MGel浸提液,继续培养24 h后,加入10 μL CCK-8溶液,再培养2 h;最后,采用酶标仪测定450 nm波长处的光密度(D)值,计算细胞增殖率<sup>[25]</sup>=(实

验组D值-空白组D值)/(对照组D值-空白组D值)×100%。

#### 1.6 MGel介导PTT对小鼠皮肤黑色素瘤B16-F10细胞杀伤的检测

##### 1.6.1 CCK-8法检测MGel介导PTT对B16-F10细胞增殖的影响

首先,根据1.5方法,将细胞和浸提液共培养12 h;然后,采用1 W/cm<sup>2</sup>的808 nm NIR光照5 min,继续培养12 h后,加入10 μL CCK-8溶液,再培养2 h;最后,根据1.5.3方法检测并计算细胞增殖率<sup>[20, 24-26]</sup>。

##### 1.6.2 Calcein-AM/PI荧光双染色法检测MGel介导PTT对B16-F10细胞的杀伤效果

首先,根据1.6.1方法,光照5 min;然后,分别将有/无光照组细胞与Calcein-AM/PI混合荧光染料共培养10 min,对活细胞和死细胞进行共染色;最后,观察B16-F10细胞的形态和染色情况,参考文献[20, 24-26]中方法,分析对B16-F10细胞的杀伤效果。

#### 1.7 统计学处理

以上所有实验均独立重复3次。采用Origin Pro 2021和GraphPad Prism 8统计软件进行分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用One-way ANOVA分析,以P<0.05或P<0.01表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功制备的MGel具有良好的理化性能

#### 2.1.1 MnO<sub>2</sub>的表征

MnO<sub>2</sub>表征如图1所示,TEM图像(图1A~B)和粒径分布图(图1C)显示,所用纳米材料中位粒径为185.2 nm;XPS图谱(图1D~E)显示,两个以653.8 eV和642.6 eV为中心的特征峰分别归属于MnO<sub>2</sub>的Mn 2p<sup>1/2</sup>和Mn 2p<sup>3/2</sup>的自旋轨道峰,Mn 2p的双峰间距约11.5 eV;XRD图谱(图1F)对比标准卡(JCPDS-39-03-0375)显示,所用纳米片为γ-MnO<sub>2</sub>。研究表明<sup>[21]</sup>,此种MnO<sub>2</sub>具有优异的光热转换性能,经808 nm NIR光照,吸收光子能量,从基态活化为激发态,经历“衰变-振动松弛”跃迁,通过碰撞返回基态,动能增加使得周围环境升温,从而产生热效应。MnO<sub>2</sub>表征结果表明,将其负载于MGel中可赋予其光热转换性能,保证有效介导PTT治疗黑色素瘤。

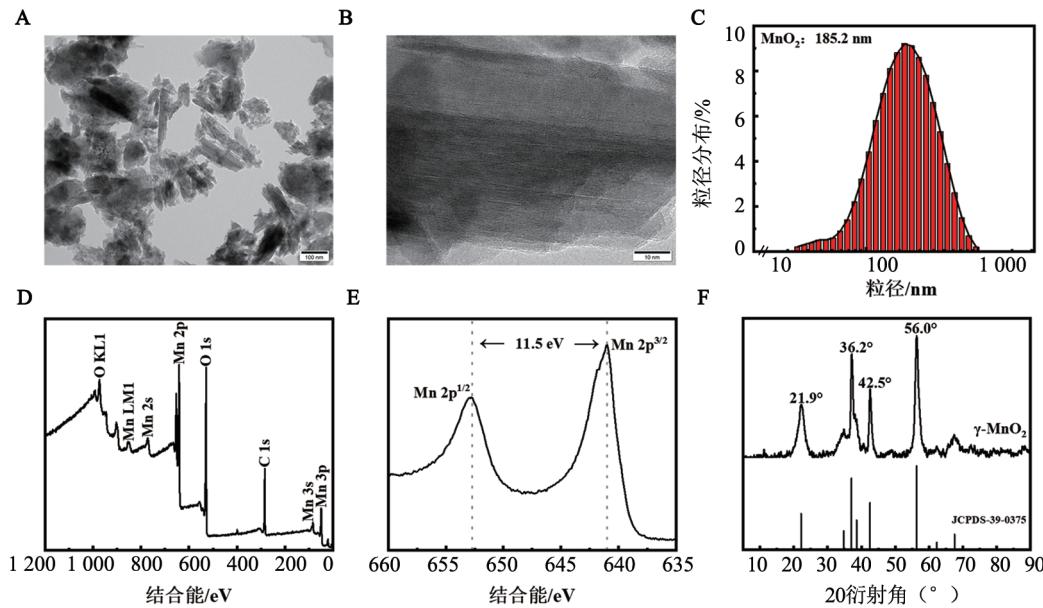
#### 2.1.2 Gel和MGel的宏观形貌

MGel宏观形貌如图2所示,无需交联剂,采用热诱导法即可成功制备MGel。Gel制备结果(图2A)显示,当Cur水悬液质量浓度≥20 mg/mL时,成功制备Gel。当Cur≤50 mg/mL时,65 °C加热形成溶胶,37 °C降温形成凝胶;当Cur>50 mg/mL时,65 °C加热



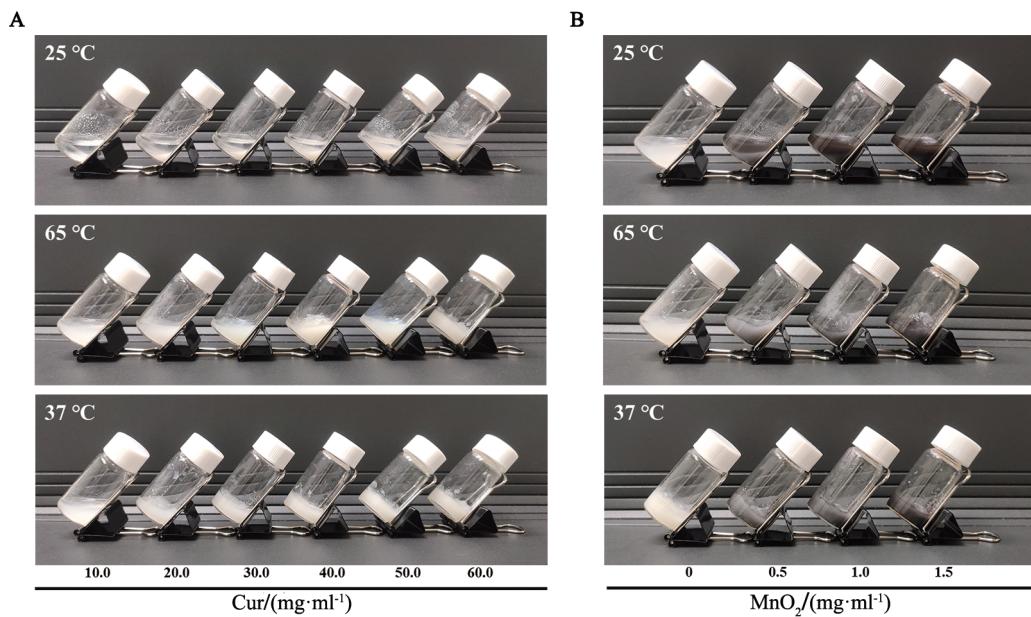
直接形成凝胶;其中,在成功交联的浓度和温度范围内,Gel强度随Cur质量浓度的增大而增强。因此,后续选用50 mg/mL Cur水悬液制备Gel。另外,Gel负

载MnO<sub>2</sub>制备MGel的结果(图2B)显示,MnO<sub>2</sub>不影响Cur的凝胶性,后续理化表征实验选用1 mg/mL MnO<sub>2</sub>制备MGel。



A~B: TEM图像(A标尺=100 nm,B标尺=20 nm);C:粒径分布图;D~E:XPS图谱;F:XRD图谱。

图1 MnO<sub>2</sub>纳米颗粒的表征



A: Gel的宏观形貌图像;B: MGel的宏观形貌图像。

图2 成功制备的Gel和MGel的宏观形貌

### 2.1.3 Gel和MGel的微观形貌

Gel和MGel的微观形貌如图3所示,Gel和MGel的SEM图像(图3A)显示,两种凝胶均呈三维网状结构,且MGel的孔径小于Gel;MGel的元素分布图像(图3B)显示均匀分布的C、O和Mn三种元素。微观表征结果表明,MGel凝胶的三维网络结构可保证透气、持水、降解以及缓释纳米载体等功能<sup>[13,23]</sup>;MGel

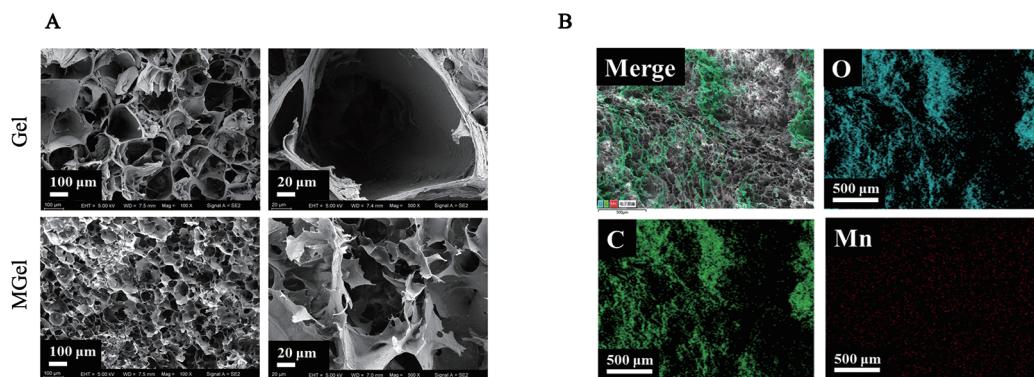
凝胶均匀负载MnO<sub>2</sub>,可获得光热转换性能,保证有效介导PTT治疗黑色素瘤。

### 2.1.4 Gel和MGel的机械性能

Gel和MGel的机械性能如图4所示,Gel的流变曲线(图4A)显示,Gel和MGel均为储能模量G',其大于损耗模量G'',符合Gel属性<sup>[23]</sup>,MGel的弹性模量可达(3 077.04±13.69)kPa;Gel和MGel的拉伸力学

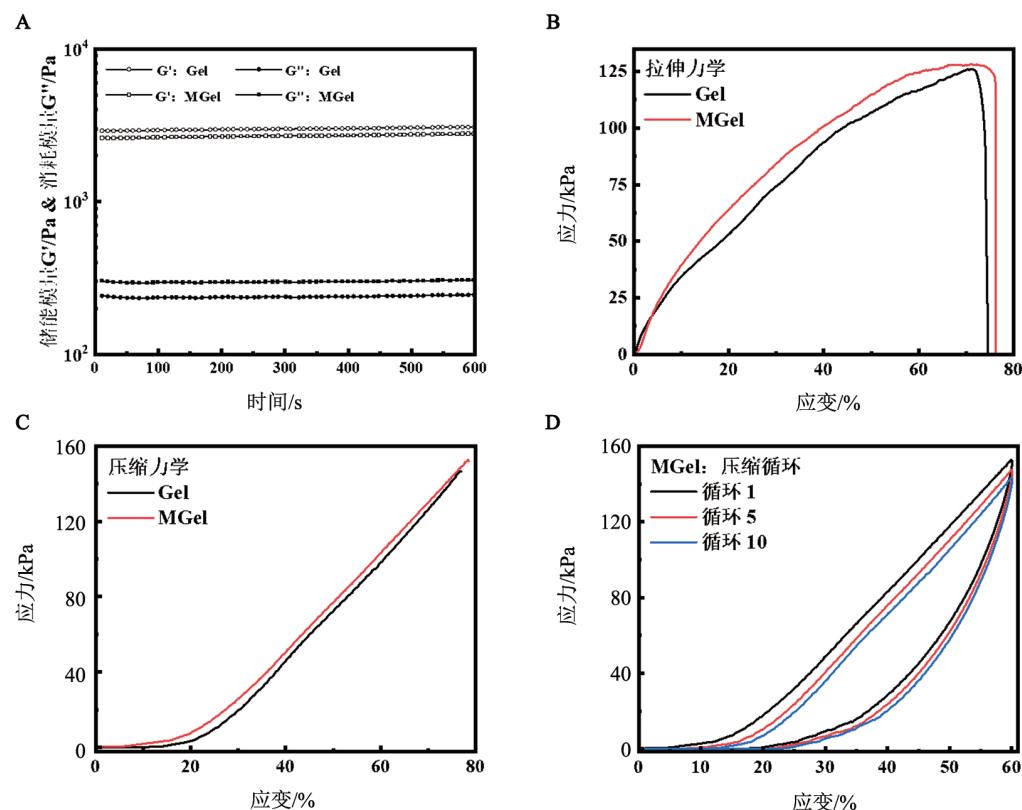
(图4B)和压缩力学(图4C)的应力-应变曲线显示,Gel和MGel均具备抗拉伸和抗压缩的性能,MGel的抗拉伸强度可达( $127.97\pm3.60$ )kPa,断裂伸长率可达( $76.08\pm1.68$ )% ,抗压缩强度可达( $151.44\pm5.23$ )kPa,断裂压缩率可达( $78.05\pm1.31$ )% ;另外,采用10次的60%形变压缩循环测试MGel的机械稳定性<sup>[23]</sup>,压缩

循环曲线(图4D)显示,MGel表现出稳定的压缩回弹性能,10次循环后仍可恢复至压缩前状态的92.37%。机械性能测试结果表明,Gel和MGel均为凝胶属性,亦具备良好机械性能,表明其可作为一种优异的医用凝胶材料<sup>[20-23]</sup>。



A: Gel 和 MGel 的 SEM 图像(标尺依次为 100 μm 和 20 μm);B: MGel 的元素分布图像(标尺均为 500 μm)。

图3 成功的制备Gel和MGel的微观形貌



A: Gel 和 MGel 的流变曲线;B: Gel 和 MGel 的拉伸应力-应变曲线;C: Gel 和 MGel 的压缩应力-应变曲线;  
D: MGel 的压缩循环应力-应变曲线。

图4 成功的制备Gel和MGel的机械性能

### 2.1.5 Gel 和 MGel 的溶胀和降解性能

Gel 和 MGel 的溶胀曲线(图5A)显示,Gel 和 MGel 在 PBS(pH=7.4)环境中均表现出低溶胀性,6 h 到达溶胀平衡,此后24 h 内溶胀率无明显变化,其

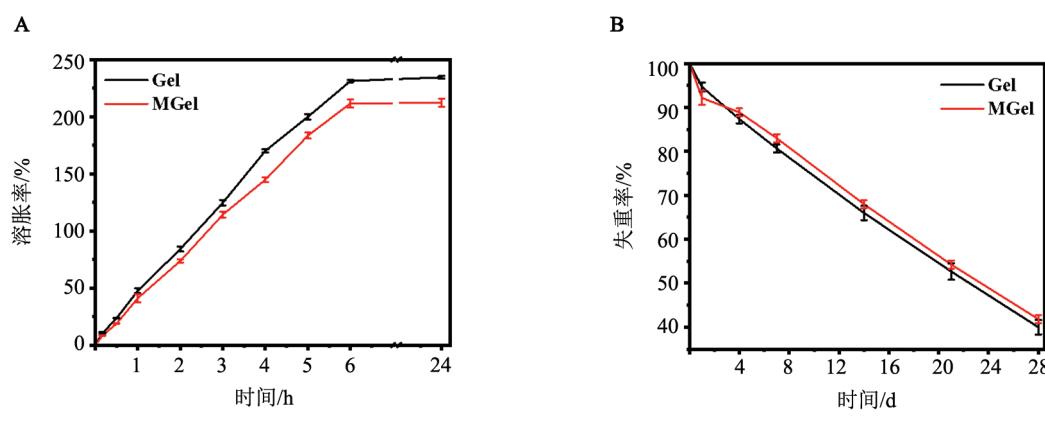
中,MGel 的溶胀率仅( $212.14\pm3.48$ )% ; MGel 的降解曲线(图5B)显示,Gel 和 MGel 均表现出可降解性,MGel 在第28天的失重率达( $41.83\pm0.92$ )% ,即降解率约为58.17%。溶胀和降解性能测试结果表明,Gel

和 MGel 水凝胶兼具一定的溶胀性、稳定性和可降解性, 可以吸收组织液并缓释纳米载体, 表明其可作为一种优异的医用水凝胶材料<sup>[13, 20]</sup>。

## 2.2 MGel 具有优异的光热转换性能

研究表明<sup>[20-21, 27-29]</sup>, PTT 抗肿瘤效果受温度影响, 当温度低于 48 °C 时, 受限于肿瘤细胞的热休克蛋白表达, PTT 无法有效杀伤肿瘤; 当温度处于 48~53 °C

范围内时, PTT 可以激活肿瘤细胞的死亡受体介导其凋亡, 从而有效杀伤肿瘤, 且不损伤正常组织; 当温度高于 53 °C 时, PTT 则造成蛋白质变性和细胞膜破坏, 杀伤肿瘤的同时亦会损伤正常组织。因此, 本研究通过对 MGel 中 MnO<sub>2</sub> 浓度和光照功率的调控, 筛选适用于 PTT 治疗黑色素瘤的水凝胶材料。



A: Gel 和 MGel 的溶胀曲线; B: Gel 和 MGel 的降解曲线。

图 5 Gel 和 MGel 的溶胀和降解性能

MGel 的光热转换性能如图 6 所示, MnO<sub>2</sub> 质量浓度影响 MGel 光热转换性能的结果(图 6A)显示, 采用 1 W/cm<sup>2</sup> 的 808 nm NIR 光照负载不同质量浓度 MnO<sub>2</sub> 的 MGel, 无 MnO<sub>2</sub> 的 Gel 无温度变化行为, 即无光热转换性能; 负载 0.5 mg/mL MnO<sub>2</sub> 的 MGel 在光照 3 min 后到达最高温度 45 °C, 然后继续光照无温度变化, 无法到达有效杀伤肿瘤的温度; 负载 1.0 mg/mL MnO<sub>2</sub> 的 MGel 在光照 4 min 后到达最高温度 50 °C, 然后继续光照无明显温度变化, 可有效杀伤肿瘤, 且不损伤正常组织; 负载 1.5 mg/mL MnO<sub>2</sub> 的 MGel 在光照 2.5 min 后即可到达 50 °C, 然后温度持续升高, 杀伤肿瘤细胞的同时亦会损伤正常组织细胞。因此, 负载 1.0 mg/mL MnO<sub>2</sub> 的 MGel 适用于黑色素瘤的 PTT 治疗。

808 nm NIR 光照功率影响 MGel 光热转换性能结果(图 6B)显示, 用不同功率光照负载 1.0 mg/mL MnO<sub>2</sub> 的 MGel, 无光照的 MGel 无温度变化行为, 即 MGel 自身无升温能力; 采用 0.5 W/cm<sup>2</sup> 光照 4 min 后到达最高温度 46 °C, 而后无明显温度变化, 同样无法有效杀伤肿瘤; 采用 1.5 W/cm<sup>2</sup> 光照 2 min 即可到达 50 °C, 而后持续升温, 同样会损伤正常组织。另外, MGel 的光热转换稳定性结果(图 6C~D)显示, 采用 1 W/cm<sup>2</sup> 的 808 nm NIR 光照负载 1.0 mg/mL MnO<sub>2</sub> 的 MGel, 5 次开关 NIR 光照的循环升温降温均未表现出明显差异, 即 MGel 水凝胶的光热转换性能稳定。MGel 光热转换性能测试结果表明, MnO<sub>2</sub> 成功赋予

MGel 优异的光热转换性能, 该性能具有 MnO<sub>2</sub> 质量浓度和 NIR 光照功率依赖性, 1.0 W/cm<sup>2</sup> 的 808 nm NIR 光照负载 1.0 mg/mL MnO<sub>2</sub> 的 MGel, 既保证有效杀伤肿瘤, 又防止正常组织受损, 适用于黑色素瘤的 PTT 治疗。

## 2.3 Gel 和 MGel 对皮肤黑色素瘤 B16-F10 细胞的杀伤作用

CCK-8 法检测 MGel 对 B16-F10 细胞增殖的影响如图 7 所示, 无 NIR 光照的情况下, Gel 和 MGel 均影响 B16-F10 细胞增殖。与对照组相比, Gel 组和 MGel 组均呈浓度依赖性抑制 B16-F10 细胞( $P<0.0001$ )。实验结果表明, Gel 表现出  $\beta$ -(1, 3)-D-三螺旋葡聚糖的抗肿瘤生物活性<sup>[17-19]</sup>; MGel 负载的 MnO<sub>2</sub> 纳米片亦发挥抗肿瘤功能<sup>[6-8, 20]</sup>, 电离出的 Mn<sup>2+</sup> 通过芬顿反应催化过氧化氢产生羟基自由基影响肿瘤细胞增殖。此外, 当 MGel 组提高质量浓度为 100 mg/mL 时, 细胞存活率为(57.40±1.73)% , 选用该浓度进行体外 PTT 研究。

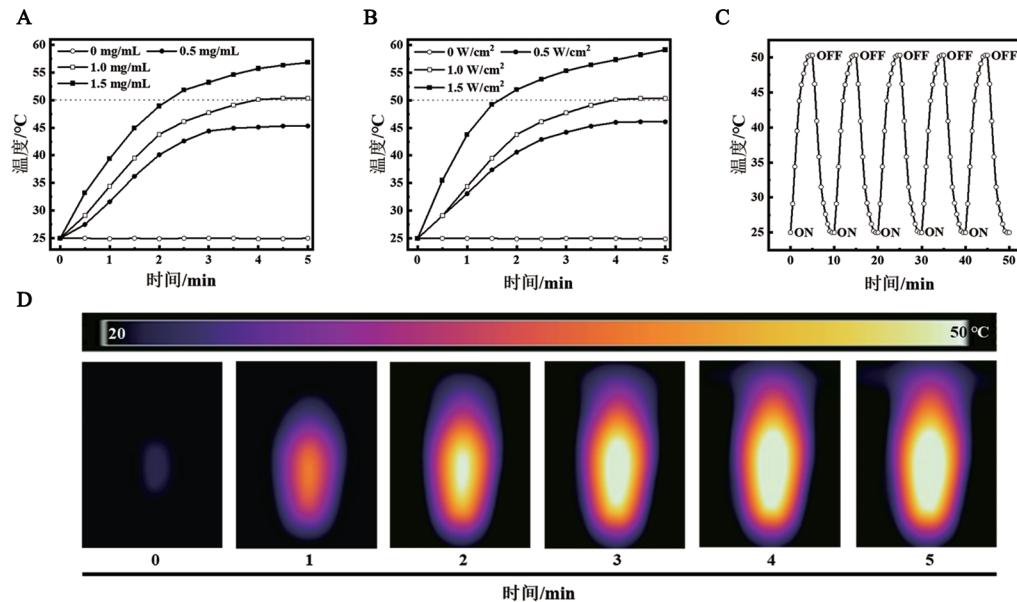
## 2.4 MGel 介导 PTT 对小鼠皮肤黑色素瘤 B16-F10 细胞的杀伤作用

### 2.4.1 CCK-8 法检测显示 MGel 介导 PTT 对 B16-F10 细胞的强大杀伤作用

CCK-8 法检测结果(图 8A)显示, MGel 介导 PTT 明显杀伤 B16-F10 细胞。对照组的细胞存活率不受 NIR 光照的影响( $P>0.05$ ), Gel 组亦不受影响( $P>0.05$ ), MGel(NIR<sup>+</sup>)组的存活率较 Gel(NIR<sup>-</sup>)组

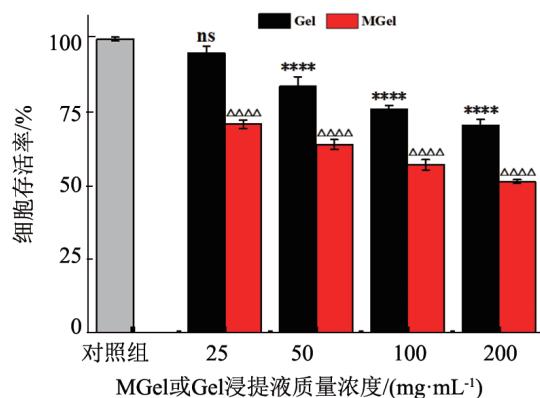
显著降低( $P<0.0001$ )，细胞存活率降低至(4.68±0.66)%。实验结果表明，对照组和Gel组的细胞存活率不受光照影响，Gel无光热转换性能，而MGel组的

存活率受光照影响，MGel在808 nm NIR光照下表现出优异的光热转换性能，可以有效杀伤B16-F10黑色素瘤细胞，显示出对B16-F10细胞优异的治疗效果。



A: 负载不同质量浓度  $\text{MnO}_2$  的 MGel 的升温曲线; B: 不同功率 808 nm NIR 光照 MGel 的升温曲线, 1W/cm<sup>2</sup> 808 nm NIR 循环光照  
负载 1 mg/mL  $\text{MnO}_2$  的 MGel 的升温曲线(C)和热图像(D)。

图6 MGel的光热转换性能

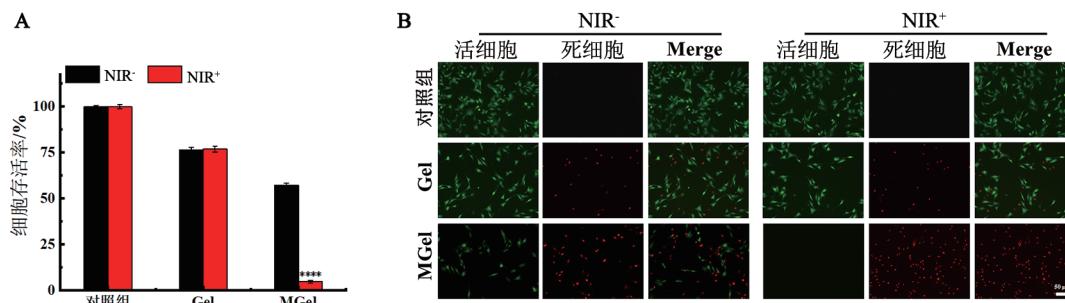


与对照组相比, \*\*\* $P<0.0001$ ; 与Gel组相比, △△△△ $P<0.0001$ 。

图7 CCK-8法检测MGel对B16-F10细胞存活的影响

#### 2.4.2 Calcein-AM/PI 荧光双染色法检测显示 MGel 介导 PTT 对 B16-F10 细胞的强大杀伤作用

Calcein-AM/PI 荧光双染色结果(图 8B)显示，活细胞为绿色、死细胞为红色。由图可知，对照(NIR<sup>-</sup>)组和对照(NIR<sup>+</sup>)组的细胞双染色结果均为绿色，无明显红色，无明显死亡；Gel(NIR<sup>-</sup>)组和 Gel(NIR<sup>+</sup>)组大部分均为绿色，少量为红色，为 Gel 诱导的少量细胞死亡；MGel(NIR<sup>-</sup>)组红绿参半，为 MGel 诱导的死亡，MGel(NIR<sup>+</sup>)组呈大量细胞红色，即 MGel 介导的 PTT 诱导细胞大量死亡( $P<0.0001$ )。实验结果表明，MGel 在 808 nm NIR 光照下可有效杀伤 B16-F10 黑色素瘤细胞，与 CCK-8 法检测结果一致。



与 MGel(NIR<sup>-</sup>) 组相比, \*\*\* $P<0.0001$ 。

图8 CCK-8法(A)和Calcein-AM/PI荧光双染色法(B, 标尺均为 50 μm)检测 MGel 介导 PTT 对 B16-F10 细胞的杀伤作用



### 3 讨 论

本研究采用热诱导法制备 Cur 水凝胶(Gel)后,物理负载 MnO<sub>2</sub> 纳米片,成功构建具有优异光热转换性能的复合水凝胶 MGel,用以介导 PTT 抗黑色素瘤。实验构建了一种兼具光热转换性能、机械性能和可降解性能的医用水凝胶 MGel,介导 PTT,拟解决传统治疗手段和纳米药物递送的诸多问题,为黑色素瘤治疗提供新的手段。

#### 3.1 MGel 均匀负载 MnO<sub>2</sub> 纳米片获得优异的光热转换性能

本研究所用 MnO<sub>2</sub> 为粒径约 185.2 nm 的纳米片,具有优异的光热转换性能,经 808 nm NIR 光照产生热效应。MGel 光热转换性能测试结果表明,MnO<sub>2</sub> 成功赋予 MGel 光热转换性能,该性能具有 MnO<sub>2</sub> 质量浓度和 NIR 光照功率依赖性;负载 1.0 mg/mL MnO<sub>2</sub> 的 MGel 在 1.0 W/cm<sup>2</sup> 的 808 nm NIR 光照 4 min 后到达最高温度 50 °C,而后继续光照无明显温度变化,该范围温度可以激活肿瘤细胞的死亡受体致其凋亡,既保证有效杀伤肿瘤,又防止正常组织受损;5 次开关 NIR 光照的循环升温降温均未表现出明显差异,即 MGel 水凝胶的光热转换性能稳定,适用于黑色素瘤 PTT 治疗。

#### 3.2 MGel 兼具药物递送和黑色素瘤细胞杀伤的皮肤创面治疗的优异性能

本研究构建的 MGel 兼具稳定负载和缓释纳米药物、透气、抗拉伸和压缩、持水以及可降解等多种功能。MGel 元素分布图和 EDS 结果表明, MGel 可以均匀负载 MnO<sub>2</sub> 纳米片;SEM 结果表明, MGel 呈三维网状结构,保证了纳米载体的释放和水凝胶的透气性而利于 MnO<sub>2</sub> 发挥肿瘤治疗的作用;机械性能测试结果表明, MGel 具有优异的抗拉伸和压缩的力学性能;溶胀和降解测试结果表明, MGel 兼具一定的溶胀性、稳定性和可降解性,可吸收组织液、缓释纳米载体,有效介导 PTT 以及不妨碍组织再生;Gel 和 MGel 的理化性能结果比较表明, MnO<sub>2</sub> 不影响 Cur 的凝胶性能,增强了 MGel 的交联强度,略提升 MGel 的机械性能。即本研究构建的 MGel 兼具药物递送和黑色素瘤杀伤的优异性能,适用于递送纳米载体以介导 PTT 抗黑色素瘤治疗。

#### 3.3 MGel 有效介导 PTT 明显杀伤黑色素瘤 B16-F10 细胞

细胞增殖实验和 Calcein-AM/PI 荧光双染色实验结果表明, MGel 介导 PTT 有效杀伤小鼠皮肤黑色素瘤 B16-F10 细胞。抑制 B16-F10 细胞的效果为 MGel (NIR<sup>+</sup>) 组 > MGel (NIR<sup>-</sup>) 组 > Gel 组 > 对照组质量。

当水凝胶浸提液浓度均为 100 mg/mL 时, MGel (NIR<sup>+</sup>) 组对 B16-F10 细胞的杀伤效果达到极致水平。原因包括:(1) MnO<sub>2</sub> 赋予 MGel 优异的光热转换性能,有效介导 PTT, 激活肿瘤细胞的死亡受体, 杀伤黑色素瘤细胞;(2) MGel 释放的 MnO<sub>2</sub> 电离出 Mn<sup>2+</sup>, 经芬顿反应催化过氧化氢产生羟基自由基杀伤黑色素瘤细胞;(3) Gel 释放的 Cur 表现出 β-(1, 3)-D-三螺旋葡萄糖的抗肿瘤生物活性。

另外, 负载 MnO<sub>2</sub> 的 MGel 可能具备抑制原发性肿瘤转移和远端肿瘤生长的潜能。研究表明<sup>[21]</sup>, MnO<sub>2</sub> 兼具光热响应和氧化还原响应功能, 可以发挥光热转换功能介导 PTT 杀伤肿瘤, 发挥过氧化物酶功能产生羟自由基杀伤肿瘤。MGel 负载并缓释 MnO<sub>2</sub>, 可提升其在肿瘤的积累和渗透, 联合 PTT 和化学动力学疗法, 或将发挥诸多抗肿瘤功能, 包括: 有效诱导肿瘤免疫原性细胞死亡, 增强 DC 的活化和成熟, 促进 CTL 的肿瘤浸润, 改善肿瘤相关成纤维细胞诱导的 CTL 细胞抗原介导的活化诱导的细胞死亡对 PTT 和 CDT 的响应, 诱导长期的抗肿瘤免疫记忆。基于此, MGel 联合 PTT 和化学动力学疗法或将实现对原发性肿瘤转移和远端肿瘤生长的抑制。

综上所述, 本研究采用安全简单的工艺所构建的 MGel 具备优异的光热转换性能, 可有效介导 PTT 杀伤黑色素瘤细胞, 亦可能具备抑制原发性肿瘤转移和远端肿瘤生长的潜能, 有望成为治疗黑色素瘤的有效手段。

### [参 考 文 献]

- [1] LI X D, ZHAO Z N, ZHANG M Y, et al. Research progress of microneedles in the treatment of melanoma[J]. J Control Release, 2022, 348: 631-647. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.06.021.
- [2] ARNOLD M, SINGH D, LAVERSANNE M, et al. Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040[J]. JAMA Dermatol, 2022, 158(5): 495-503. DOI: 10.1001/jamadermatol.2022.0160.
- [3] LIU J J, SHI J J, NIE W M, et al. Recent progress in the development of multifunctional nanoplatform for precise tumor phototherapy[J/OL]. Adv Healthcare Mater, 2021, 10(1): 2001207 [2023-06-05]. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001207>. DOI: 10.1002/adhm.202001207.
- [4] ZHONG Y T, CEN Y, XU L, et al. Recent progress in carrier-free nanomedicine for tumor phototherapy[J/OL]. Adv Healthc Mater, 2023, 12(4): 202202307[2023-06-05]. <https://doi.org/10.1002/adhm.202202307>. DOI: 10.1002/adhm.202202307.
- [5] ZHAO L P, ZHANG X, WANG X X, et al. Recent advances in selective photothermal therapy of tumor[J/OL]. J Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 335[2023-06-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34689765/>. DOI: 10.1186/s12951-021-01080-3.
- [6] ZHAO Y Y, PAN Y W, ZOU K L, et al. Biomimetic manganese-

- based theranostic nanoplatform for cancer multimodal imaging and twofold immunotherapy[J]. *Bioact Mater*, 2022, 19: 237-250. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.04.011.
- [7] YANG G B, JI J S, LIU Z. Multifunctional MnO<sub>2</sub> nanoparticles for tumor microenvironment modulation and cancer therapy[J]. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2021, 13(6): 17201737 [2023-06-05]. <https://doi.org/10.1002/wnan.1720>. DOI: 10.1002/wnan.1720.
- [8] ZHU D, ZHU X H, REN S Z, et al. Manganese dioxide (MnO<sub>2</sub>) based nanomaterials for cancer therapies and theranostics[J]. *J Drug Target*, 2021, 29(9): 911-924. DOI: 10.1080/1061186X.2020.1815209.
- [9] CAO H, DUAN L X, ZHANG Y, et al. Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 426-457. DOI: 10.1038/s41392-021-00830-x.
- [10] MANZOOR A, DAR A H, PANDEY V K, et al. Recent insights into polysaccharide-based hydrogels and their potential applications in food sector: a review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 213: 987-1006. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.044.
- [11] LIU Y L, JIN C, YANG Z Z, et al. Recent advances in lignin-based porous materials for pollutants removal from wastewater[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 187: 880-891. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.152.
- [12] SONG B, LIANG H X, SUN R R, et al. Hydrogel synthesis based on lignin/sodium alginate and application in agriculture[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 144: 219-230. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.082.
- [13] KASS L E, NGUYEN J. Nanocarrier-hydrogel composite delivery systems for precision drug release[J]. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2022, 14(2): 1756 [2023-06-05]. <https://doi.org/10.1002/wnan.1756>. DOI: 10.1002/wnan.1756.
- [14] LIU W, NIE Y, ZHANG M, et al. A novel nanosponge-hydrogel system-based electrochemiluminescence biosensor for uric acid detection[J]. *Luminescence*, 2022, 37(9): 1524-1531. DOI: 10.1002/bio.4326.
- [15] GUAN T, LI J Y, CHEN C Y, et al. Self-assembling peptide-based hydrogels for wound tissue repair[J/OL]. *Adv Sci*, 2022, 9(10): 2104165[2023-06-05]. <https://doi.org/10.1002/advs.202104165>. DOI: 10.1002/advs.202104165.
- [16] TAN B W, HUANG L X, WU Y Z, et al. Advances and trends of hydrogel therapy platform in localized tumor treatment: a review[J]. *J Biomed Mater Res*, 2021, 109(4): 404-425. DOI: 10.1002/jbm.a.37062.
- [17] CHAUDHARI V, BUTTAR H S, BAGWE-PARAB S, et al. Therapeutic and industrial applications of curdlan with overview on its recent patents[J/OL]. *Front Nutr*, 2021, 8: 646988[2023-06-05]. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.646988>. DOI: 10.3389/fnut.2021.646988.
- [18] SATO F, NAKAMURA Y, KATSUKI A, et al. Curdlan, a microbial β-glucan, has contrasting effects on autoimmune and viral models of multiple sclerosis[J/OL]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 805302 [2023-06-05]. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.805302>. DOI: 10.3389/fcimb.2022.805302.
- [19] 俞珊,段孟霞,童彩玲,等.可得然胶功能性质及其在食品中的应用研究进展 [D]. 食品科学, 2022, 43(19): 277-284. DOI: 10.7506/SPKX1002-6630-20220930-348.
- [20] WANG S, ZHENG H, ZHOU L, et al. Injectable redox and light responsive MnO<sub>2</sub> hybrid hydrogel for simultaneous melanoma therapy and multidrug-resistant bacteria-infected wound healing[J/OL]. *Biomaterials*, 2020, 260: 120314[2023-06-05]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120314>. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120314.
- [21] FAN M, JIA L, PANG M H, et al. Injectable adhesive hydrogel as photothermal-derived antigen reservoir for enhanced anti-tumor immunity[J/OL]. *Adv Funct Mater*, 2021, 31(20): 2010587[2023-06-05]. <https://doi.org/10.1002/adfm.202010587>. DOI: 10.1002/adfm.202010587.
- [22] QIAN Y N, ZHENG Y J, JIN J, et al. Immunoregulation in diabetic wound repair with a photoenhanced glycyrrhizic acid hydrogel scaffold[J/OL]. *Adv Mater*, 2022, 34(29): 2200521. <https://doi.org/10.1002/adma.202200521>. DOI: 10.1002/adma.202200521.
- [23] LIANG Y P, ZHAO X, HU T L, et al. Adhesive hemostatic conducting injectable composite hydrogels with sustained drug release and photothermal antibacterial activity to promote full-thickness skin regeneration during wound healing[J/OL]. *Small Weinheim Der Bergstrasse Ger*, 2019, 15(12): e1900046[2023-06-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30786150/>. DOI: 10.1002/smll.201900046.
- [24] DING X L, LIU M D, CHENG Q, et al. Multifunctional liquid metal-based nanoparticles with glycolysis and mitochondrial metabolism inhibition for tumor photothermal therapy[J/OL]. *Biomaterials*, 2022, 281: 121369[2023-06-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35026671/>. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2022.121369.
- [25] 刘驰,陈亮,王万晨,等.大黄素联合紫杉醇对B16-F10黑色素瘤细胞的抑制作用及其机制探究[D].中国美容整形外科杂志,2021,32(12): 751-755. DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2021.12.014
- [26] 秦艳强,晋佳路,李娜,等.冬凌草甲素逆转黑色素瘤细胞顺铂耐药的作用及机制[D].中国肿瘤生物治疗杂志,2023,30(3): 217-222. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.005
- [27] WANG S Y, CHEN B H, OUYANG L P, et al. A novel stimuli-responsive injectable antibacterial hydrogel to achieve synergistic photothermal/gene-targeted therapy towards uveal melanoma [J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(18): e2004721[2023-06-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34331418/>. DOI: 10.1002/advs.202004721.
- [28] MA L L, ZHOU Y L, ZHANG Z, et al. Multifunctional bioactive Nd-Ca-Si glasses for fluorescence thermometry, photothermal therapy, and burn tissue repair[J/OL]. *Sci Adv*, 2020, 6(32): eabb1311[2023-06-05]. <https://doi.org/10.1126/sciadv.eabb1311>. DOI: 10.1126/sciadv.eabb1311.
- [29] 沈佩,周学筱,石凡,等.肿瘤热疗生物学机制研究进展[D].中华放射肿瘤学杂志,2021,30(12): 1340-1344. DOI: 10.3760/cma.j.cn113030-20210227-00083.

[收稿日期] 2023-06-10

[修回日期] 2023-08-06

[本文编辑] 黄静怡,沈志超