

中图分类号: R445.2

论文编号: _____

学科分类号: 320.11

密 级: 公 开

安徽理工大学

硕 士 学 位 论 文

多巴胺改性没食子酸锰基纳米诊疗剂的构建及其 在肿瘤成像与治疗中的应用

作者姓名: 刘雅婷

专业名称: 影像医学与核医学

研究方向: 纳米分子影像

导师姓名: 陈峰 研究员

赵新宇 副研究员

导师单位: 同济大学附属第十人民医院

答辩委员会主席: 何创龙 教授

论文答辩日期: 2024 年 5 月 27 日

安徽理工大学研究生院

2024 年 5 月 27 日

A Dissertation in Imaging and Nuclear Medicine

**Construction of dopamine modified manganese gallate
based nanotherapeutic agent and its application in
tumor imaging and treatment**

Candidate: Yating Liu

Supervisor: Feng Chen

Xinyu Zhao

Medical School

Anhui University of Science and Technology

No. 168, Taifeng Street, Huainan, 232001, Anhui, P. R. China

摘要

目的：癌症是一种由细胞异常增生形成的疾病，其特点是细胞不受控制地生长并可能扩散到其他组织。癌症种类繁多，根据起源组织可以分为肺癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌等。癌症的发病率因地区、年龄、性别等因素而有差异。在一些工业化国家，癌症已经成为最常见的死因之一。据统计，每年全球有数百万新病例被诊断出患有癌症，而其中约一半会发生死亡。提升公众对抗癌症的认识与预防意识，同时加强癌症的检测与早期识别，这样可以降低癌症的患病率与生命危险。目前，临床上对于癌症疾病的治疗一般还是使用传统的治疗方法，例如手术切除、放射治疗和化学疗法，但是这些治疗方法都存在许多的缺陷。例如肿瘤摘除不完全、易复发、对组织造成损失以及具有一定的辐射损伤等。为此需要寻求更加有效的治疗模式，在近些年发展起来的治疗方法中，光热治疗（PPT）能够克服传统疗法的缺点和副作用，并且它的治疗方式非常精确，可以进行高度的选择。此外，将不同功能的材料结合起来，构建一体化平台，使其同时用于成像诊断和癌症治疗成为了纳米技术成了发展的热点。构建诊疗一体化平台有望实现个性化医疗、达到实时检测的过程和疗效实时反馈。因此，将成像造影剂和治疗药物相结合构建诊疗一体化纳米平台是一项富有挑战的任务。本论文工作中，我们设计制备了一种磁性复合粒子生物材料——多巴胺改性没食子酸锰纳米诊疗剂，并研究了它在乳腺癌（4T1 细胞系）中的治疗应用。复合纳米探针通过高渗透的长滞留效应（Enhanced permeability and retention effect, EPR）进入肿瘤组织后，然后被肿瘤组织摄取，在偏酸性的肿瘤微环境（Tumor microenvironment, TME）中， Mn^{2+} 的释放会使得 MRI 信号增强，从而更好地进行诊断。与此同时，剩余的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒可以在近红外（NIR）激光照射下作为光热疗法（PPT）剂。因此，该工作提供了一种新型纳米诊疗剂，在肿瘤诊疗一体化中具有潜在的应用。

方法：（1）Mn-GA@PDA 纳米材料的制备及其理化性能。首先以水作为反应体系，加入一定量的四水氯化锰（ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ）和没食子酸，使用磁力搅拌器混合均匀后转移至反应釜内，置于 150 °C 烘箱内反应 3 h，离心干燥，得到 Mn-GA 纳米颗粒。然后再取一定量的 Mn-GA 纳米颗粒溶于 pH 为 8.5 的 Tris-HCl 溶液的盐酸多巴胺溶液中，搅拌 24 h，离心干燥，得到 Mn-GA@PDA 纳米颗粒。通过透射电子显微镜、扫描电子显微镜、Zeta 电位分析、X 射线衍射、粒径分析、X 射线光电子能谱、元素扫描和傅里叶变化红外光谱对 Mn-GA@PDA 纳米材料的结构组成、尺寸大小、形貌特征及化学性质进行表征和分析。通过分光光度法来检测

Mn²⁺在不同 pH 条件 Mn-GA@PDA 纳米颗粒中的释放。

(2) Mn-GA@PDA 纳米材料体外光热性能及其核磁性能研究。通过红外热像仪记录不同浓度的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒在近红外 808 nm 激光下照射 10 min 的温度升温曲线, 来探究 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的光热性能。对于核磁性能研究则将不同浓度的纳米材料放置在小动物磁共振成像仪上, 进行弛豫时间的测定。

(3) Mn-GA@PDA 纳米材料的细胞毒性研究。通过 MTT 法和活死细胞染色, 探究 Mn-GA@PDA 纳米材料的细胞毒性和抗肿瘤效果。

(4) Mn-GA@PDA 纳米材料对小鼠乳腺癌模型的作用研究。首先构建 Balb/c 小鼠乳腺癌皮下瘤模型, 每三天在肿瘤内注射 Mn-GA@PDA 纳米材料并使用 808 nm 激光进行治疗。记录肿瘤大小, 评估肿瘤生长抑制作用。

(5) Mn-GA@PDA 纳米材料的体内磁共振成像研究。首先构建 Balb/c 小鼠乳腺癌皮下瘤模型, 然后尾静脉注射 Mn-GA@PDA 纳米材料并使用小动物磁共振成像仪器, 对弛豫时间进行测定。

(6) 通过主要器官的 HE 染色评估 Mn-GA@PDA 纳米材料是否对主要器官存在潜在损失, 通过 Ki67 来评估 Mn-GA@PDA 纳米材料对肿瘤细胞增殖能力的影响。

结果: (1) 产物 Mn-GA@PDA 纳米材料是一种形态均匀、分布均匀的棒状纳米颗粒, TEM 显示尺寸大小为 100×20 nm, 平均水合粒径约为 144.16 nm, Zeta 电位约为 -26.53 mV。

(2) 体外实验表明 Mn-GA@PDA 纳米材料具有一定的光热效果和核磁信号。在浓度为 300 μg mL⁻¹ 时, 用 808 nm 近红外照射 10 min, 温度能够升到 50 °C。经过体外核磁信号显示纳米材料具有一定的显影能力, 且随着 pH 的下降, r₁ 的弛豫率会上升, r₂ 的弛豫率会下降。当 pH 为 5.5 时计算得到摩尔纵向弛豫率 r₁=3.9 mM⁻¹s⁻¹, r₂=24.1 mM⁻¹s⁻¹; 当 pH 为 7.4 时计算得到摩尔纵向弛豫率 r₁=4.4 mM⁻¹s⁻¹, r₂=15.1 mM⁻¹s⁻¹。

(3) Mn-GA@PDA 纳米材料表现出显著的肿瘤杀伤效果, 且杀伤效果与浓度成正比。体内实验表明, Mn-GA@PDA 纳米材料可显著抑制小鼠中乳腺癌的增殖。Mn-GA@PDA 纳米材料在体内未观察到明显的肝肾毒性及对主要器官的损伤, 表现出较好的生物安全性和临床应用潜能。

(4) 体内 MRI 成像中, Mn-GA@PDA 纳米材料具有一定的成像效果。

结论: 本研究构建的 Mn-GA@PDA 纳米材料具有较好的光热性能和一定的磁共振成像信号, 有望为肿瘤一体化诊疗提供研究思路和诊疗方案。

图 23 表 6 参 80

关键词：磁性纳米复合物；MRI 造影剂；光热疗效；诊疗一体化；纳米材料

分类号：R445.2

Abstract

Objective: Cancer is an abnormal proliferation of cells, which is characterized by an uncontrolled growth of cells that may spread to other tissues. Different types of cancer can be classified into lung, breast, colon, and stomach. The incidence of cancer varies according to area, age, sex and so on. Cancer is a leading cause of death in some industrial countries. According to statistics, millions of new cases of cancer are diagnosed worldwide every year, and about half of them will lead to death. Therefore, improving public awareness of cancer and prevention, as well as strengthening cancer screening and early diagnosis are important measures to reduce cancer incidence and mortality. At present, the clinical treatment of cancer is generally still using traditional treatment methods. Despite the use of traditional treatment modalities, such as surgical resection, radiotherapy, and chemotherapy, these approaches have many drawbacks. For example, tumor removal is incomplete, easy to relapse, tissue loss, and radiation damage. There is a need for more effective treatment modalities. Among the treatments that have been developed in recent years, photothermal therapy (PPT) can overcome the shortcomings and side effects of traditional therapy, and its treatment method is very precise and can be highly selected. In addition, combining materials with different functions to build an integrated platform for imaging diagnosis and treatment at the same time has become a hotspot in the development of nanotechnology. The construction of an integrated diagnosis and treatment platform is expected to realize personalized medicine, real-time detection process and real-time feedback of efficacy. Therefore, it is a challenging task to combine imaging contrast agents and therapeutic drugs to construct an integrated diagnosis and treatment nano platform.

In this work, we designed and fabricated a magnetic particle composite biomaterial, dopamine (DA) -modified manganese gallate (Mn-GA@PDA NPs), and investigated its therapeutic effect on mouse breast cancer (4T1 cell). The composite nanoprobe enters the tumor tissue through enhanced permeability and retention effect (EPR), and then is taken up by the tumor tissue, and can be detected in the acidic tumor microenvironment, the release of Mn^{2+} will enhance the MRI signal for better diagnosis. Meanwhile, the remaining Mn-GA@PDA NPs can be used as photothermal therapy (PPT) agents under near-infrared (NIR) laser irradiation. Therefore, this work provides a novel

nano-therapeutic agent with potential application in the integration of cancer diagnosis and treatment.

Methods: (1) Preparation and physical and chemical properties of Mn-GA@PDA nanomaterials. First, water was used as the reaction system, and a certain amount of manganese chloride tetrahydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) and gallic acid were added. The mixture is transferred to the reaction vessel after magnetic stirring and mixing. It is placed in the oven at 150 °C for 3 h and the Mn-GA nanoparticles were obtained by centrifugation and drying. Then a further amount of Mn-GA was dissolved in the dopamine hydrochloride solution of Tris-HCl solution at pH 8.5, stirred for 24 h, and dried by centrifugation to obtain Mn-GA@PDA nanoparticles. The structure, size, morphology and chemical properties of Mn-GA@PDA nanomaterials were characterized by X-ray diffraction (XRD), Zeta potential analysis (Zeta), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), particle size analysis (DLS), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), elemental scanning and Fourier change infrared spectroscopy (FTIR). The release of Mn^{2+} in different pH conditions Mn-GA@PDA was detected by spectrophotometry.

(2) Photothermal and nuclear magnetic properties of Mn-GA@PDA nanoparticles *in vitro*. The temperature heating curves of Mn-GA@PDA nanoparticles with different concentrations irradiated by near-infrared 808 nm laser for 10 min were recorded by infrared thermography to explore the photothermal properties of Mn-GA@PDA nanoparticles. For NMR properties, different concentrations of nanomaterials were placed on a small animal magnetic resonance apparatus, and the relaxation time was measured.

(3) Cytotoxicity study of Mn-GA@PDA nanomaterials. MTT assay and live/dead cell staining were used to investigate the cytotoxicity and anti-tumor effect of Mn-GA@PDA nanomaterials. Phagocytosis of Mn-GA@PDA nanomaterials by mouse breast cancer cells (4T1) was studied by immunofluorescence staining.

(4) The effect of Mn-GA@PDA nanomaterials on mouse breast cancer model. Firstly, a Balb/c mouse subcutaneous breast cancer model was constructed, and Mn-GA@PDA nanomaterials were injected into the tumor every three days and treated with 808 nm laser. Tumor size was recorded and tumor growth inhibition was evaluated.

(5) *In vivo* magnetic resonance imaging study of Mn-GA@PDA nanomaterials. First, the Balb/c mouse subcutaneous model was constructed, and then the nanostructured material was injected into the tail vein. The relaxation time was measured by using a small animal magnetic resonance imaging instrument.

(6) HE staining of main organs was used to estimate whether there was potential damage to main organs caused by Mn-GA@PDA nanomaterials, and Ki67 was used to analyze the effect of Mn-GA@PDA nanomaterials on the proliferation ability of tumor cells.

Results: (1) The product Mn-GA@PDA nano material is a rod-like nanoparticle with uniform morphology and uniform distribution. TEM shows that the size is 100×20 nm, the average hydrated particle size is about 144.16 nm, and the Zeta potential is about -26.53 mV.

(2) *In vitro* experiments showed that Mn-GA@PDA nanomaterials had a certain photothermal effect and nuclear magnetic signal. The temperature was able to rise to 50°C after irradiation with 808 nm NIR for 10 min at a concentration of 300 µg mL⁻¹. *In vitro* NMR signals showed that the nanomaterials had a certain imaging ability, and with the decrease of pH, the relaxation rate of r_1 increased, and the relaxation rate of r_2 decreased. When the pH=5.5, the molar longitudinal relaxation rate $r_1=3.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r_2=24.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; The molar longitudinal relaxation rate $r_1=4.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $r_2=15.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ were calculated at pH 7.4.

(3) The Mn-GA@PDA nanomaterials exhibited significant effectiveness in killing tumors, with the efficacy increasing in correlation with the concentration applied. *In vivo* experiments showed that. Mn-GA@PDA Nanomaterials can significantly inhibit the proliferation of breast cancer in mice. The nanomaterials have no obvious liver and kidney toxicity and damage to major organs *in vivo*, showing good biological safety and clinical application potential.

(4) *In vivo* MRI imaging results show that Mn-GA@PDA nanomaterials have a certain imaging effect.

Conclusion: The Mn-GA@PDA nanomaterials constructed in this study have good photothermal properties and certain magnetic resonance imaging signals, which are expected to provide research ideas and treatment plans for the integrated diagnosis and treatment of cancer.

Figure 23 Table 6 Reference 80

Key words: magnetic nanocomposite; MRI contrast agent; photothermal efficacy; diagnosis and treatment integration; Nanomaterials

Chinese books catalog: R445.2

目 录

第一章 引言.....	1
1.1 肿瘤的概述及治疗现状.....	1
1.2 磁共振成像概述.....	1
1.2.1 磁共振成像原理.....	1
1.2.2 磁共振造影剂.....	2
1.3 锰基磁共振造影剂.....	3
1.3.1 氧化锰纳米颗粒.....	4
1.3.2 锰掺杂的纳米颗粒.....	5
1.3.3 锰络合物和锰基金属有机框架.....	6
1.4 锰基纳米材料探针在肿瘤诊断和治疗中的应用	8
1.4.1 锰基纳米材料的成像性能.....	8
1.4.2 锰基纳米材料的抗肿瘤性能.....	12
1.5 研究课题的提出与研究意义	15
第二章 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的制备及性能表征	16
2.1 引言.....	16
2.2 实验条件与实验材料.....	17
2.2.1 实验所需仪器设备	17
2.2.2 实验所需试剂耗材.....	18
2.2.3 实验方法.....	18
2.3 结果与讨论.....	20
2.3.1 Mn-GA@PDA 纳米颗粒理化性能表征	20
2.3.2 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的弛豫性能	24
2.3.3 pH 触发 Mn-GA@PDA 纳米材料释放 Mn^{2+}	25
2.3.4 Mn-GA@PDA 纳米材料的类芬顿反应活性检测	26
2.3.5 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的光热性能	29
2.4 本章小结.....	31
第三章 Mn-GA@PDA 纳米颗粒体外研究	32
3.1 引言.....	32
3.2 实验条件与实验方法.....	32
3.2.1 实验所需仪器设备	32
3.2.2 实验所需试剂耗材.....	33
3.2.3 实验方法.....	33
3.3 结果与讨论.....	35
3.3.1 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的溶血性	35

3.3.2 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的细胞毒性及产生 ROS 的能力	36
3.3.3 Mn-GA@PDA 纳米颗粒光热消融肿瘤细胞	38
3.4 本章小结	40
第四章 Mn-GA@PDA 纳米颗粒体内研究	41
4.1 引言	41
4.2 实验条件与实验方法	41
4.2.1 实验所需仪器设备	41
4.2.2 实验所需试剂耗材	42
4.2.3 实验方法	42
4.3 结果与讨论	43
4.3.1 Mn-GA@PDA 纳米颗粒体内磁共振成像	43
4.3.2 Mn-GA@PDA 纳米颗粒体内光热治疗肿瘤	44
4.4 本章小结	47
总结与展望	48
参考文献	49

英文缩写词对照表

Abbreviation Index

英文缩写	英文全称	中文全称
BC	Breast cancer	乳腺癌
4T1	Mouse breast cancer cells	小鼠乳腺癌细胞
DLS	Dynamic light scattering	动态光散射
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	细胞培养基
ESR	Electron spin resonance	电子自旋共振光谱
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy	傅里叶变换红外光谱
GA	Gallate	没食子酸
HE	Hematoxylin-eosin staining	苏木静-伊红染色法
MB	Methylene blue	亚甲基蓝
Mn-GA NPs	Manganese-gallate nanoparticles	没食子酸锰纳米颗粒
Mn-GA@PDA NPs	Dopamine modified manganese gallate nanoparticles	多巴胺改性没食子酸锰纳米颗粒
PDA	Polydopamine	聚多巴胺
ROS	Reactive oxygen	活性氧
SEM	Scanning electron microscopy	扫描电子显微镜
TEM	Transmission electron microscopy	透射电子显微镜
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy	X 射线光电子能谱分析
XRD	X-Ray Diffraction	X 射线衍射分析

第一章 引言

1.1 肿瘤的概述及治疗现状

根据世界卫生组织（World Health Organization, WHO）的报道，癌症的发病率和死亡率呈逐年上升趋势，已经成为一个全球性的公共卫生问题，每年全球约有 1000 多万人死于癌症，目前尚无有效的防治措施，严重危害着人类的生命安全^[1, 2]。在全球各地国家和地区中，肺癌、结直肠癌、胃癌、肝癌和乳腺癌等恶性肿瘤在世界范围内的发病率和死亡率都很高，严重危害着人类的健康^[3]。因此，对癌症控制和癌症治疗的研究目前成为了全球性卫生战略的重中之重。

目前，肿瘤的治疗主要分为传统治疗方法和新兴治疗方法。传统治疗方法主要包括手术切除法^[4]、化学疗法^[5]和放射疗法^[6]。虽然外科手术切除是临床上肿瘤治疗的主要治疗手段，但手术切除很容易导致因切除不彻底而造成肿瘤的复发或转移。化学疗法是通过使用化学药物来抑制肿瘤生长，但极易引起耐药性，而且副作用很大^[7, 8]。尽管放疗疗效较好，但是由于各种放射线的辐射作用，很容易损伤治疗周边正常组织引起全身性毒性副作用而且难以应用在敏感组织或器官上^[9, 10]。传统治疗方法不能有效的治疗肿瘤，同时也不能保证患者的生活质量，因此需要寻求更加高效的治疗方式。

在新兴肿瘤治疗方法中，光热疗法（PPT）和化学动力疗法（CDT）在过去的几十年中受到了广泛的关注，两者能够有效的弥补传统治疗方法带来的疼痛大、效果差等缺陷，能够实现更高效的肿瘤治疗^[11, 12]。光热治疗是通过光热剂在近红外区域进行强光吸收，将光转化为局部热能，温度选择性消灭癌细胞。化学动力疗法是利用纳米材料原位发生芬顿反应或者类芬顿类反应，将过氧化氢转化为羟基自由基，从而诱导细胞凋亡，对肿瘤细胞具有较高的毒性。随着纳米技术的发展，将光热疗法和化学动力法联合的治疗方式也得到了广泛的研究，并且在肿瘤的治疗上具有很大的潜能^[13-15]。

1.2 磁共振成像概述

1.2.1 磁共振成像原理

磁共振成像是目前医学检测中最常见的检查技术之一，MRI 所提供的信息量较其他医学影像学技术^[16]更丰富。磁共振成像具有无创、非电离、无辐射、多维成像、实时监测等特点。磁共振成像可以同时显示横断面、矢状面、冠状面和其他倾斜面的断层影像，从而有效地避免了 CT 扫描时产生的伪影。另外，磁共振成像因其对软组织的高分辨能力，在临床上得到了广泛的应用，成为肿瘤早期检测的主要手段。此外，MRI 成像可以详细显示肿瘤信息，包括肿瘤的位置大小，以减少治疗的副作用，被广泛的用于肿瘤治疗^[17-19]。MRI 是一个具有很大发展价值的医学影像学新领域，可以在生物医学领域开展深入研究。

磁共振原理主要是原子核的自旋运动引起的，是利用原子核自旋产生磁场，也叫核磁^[20]。MRI 中最常使用核磁共振的原子核就是 ^1H ，这是因为 ^1H 是人体内含量最丰富且最简单的核磁共振原子核。当原子核的质子数或中子数为偶数时，磁场之间会相互抵消，但当存在不成对的奇数质子或中子数时，会产生自旋并带来磁性。简单的说，该技术的工作原理是通过将人体暴露在一种特殊的磁场下，运用无线电频率的脉冲来刺激人体内的氢原子核，使其产生共振效应从而获得能量。当这个脉冲停止时，氢原子核会以特定频率发出射电信号，将吸收的能量释放出来。这些释放的信号通过外部的接收器接收，并经过电子计算机处理，最终生成影像信号，以实现对人体疾病的分析和诊断^[21]。由于人体体内各组织、正常与病变组织中水分的含量及赋存状态均有差异，因而其横向弛豫时间与纵向弛豫时间也不尽相同，利用它们在磁共振成像上的差异，可对病灶进行分析与诊断，从而达到病灶探测的目的^[22]。

1.2.2 磁共振造影剂

在核磁共振成像过程中，影像的质量和准确性对诊断结果至关重要。磁共振造影剂是一种特殊的物质，能够通过注入体内，增强核磁共振图像的对比度，以此方式更加明确地来展示组织和器官的结构和功能^[23]。使用磁共振造影剂可以提供更多的功能信息，如血流动力学、代谢情况等，帮助医生更好地识别病变、评估疾病的严重程度以及跟踪治疗效果^[24]。磁共振造影剂大体上可以划分为阳性造影剂（T1 造影剂）和阴性造影剂（T2 造影剂）。T1 造影通过是加速纵向弛豫恢复，缩短纵向弛豫时间，使得 T1 信号强度增高，从而产生明亮的图像；反之 T2 造影则是缩短横向弛豫速率，使得 T2 的信号强度增高，从而产生暗的图像。目前

研究最广泛的 T2 造影剂是超顺磁性氧化铁，而在临床上最常用的 T1 造影剂主要是以 Gd-DTPA 为代表的 Gd^{3+} 系列顺磁性金属配合物。然而，近年来研究发现，钆基 MRI 造影剂在人体中无法正常代谢和降解，多次使用可能会导致在各个器官中累积，从而造成一定的生物安全问题^[25]。尤其是在肾脏中容易发生不可逆的肾系统纤维化（renal systemic fibrosis, NSF），这使得钆基 MRI 造影剂的安全性和生物相容性受到质疑^[26]。因此，在医学和生物学领域，研究人员正在积极寻找其副作用相对较小且可以替代 Gd 复合物的 T1 造影剂。

最近，锰基 MRI 造影剂引起了人们的关注。与 Gd^{3+} 相似， Mn^{2+} 离子的外围存在五个未成对的电子，有自旋量子数高、电子弛豫时间长等优点^[27]。锰元素不仅是一种具有生物活性的微量元素，也是人体许多酶活性中心的辅助因子，能够维持正常的生长和发育，在营养代谢、骨骼形成和自由基防御系统中很重要^[28]。此外，研究数据表明锰基配合物具有较好的生物相容性和较低的毒性，在使用后能够通过肾脏排泄的方式从体内排出^[29]。随着纳米技术的发展，不同应用功能的锰基 MRI 造影剂也被广泛研究，研究人员致力于发现具有高灵敏度、特异度、生物降解性、生物相容性、水分散性、高对比度有效性和改善物理化学稳定性的高效多功能磁共振造影剂^[30, 31]。

1.3 锰基磁共振造影剂

锰的功能纳米材料由于具有相对较高的磁化自旋率、快速的水颗粒交换速率、低副作用和良好的生物相容性，在磁共振成像领域受到了极大的关注。近年来，随着生物医学和纳米技术的进步，基于不同材料体系合成了多种锰基 MRI 造影剂^[32]，并出现了一系列多用途的锰纳米复合材料（图 1-1）。锰基 MRI 造影剂主要分为氧化锰纳米颗粒（nanoparticles, NPs）、锰掺杂的纳米颗粒和锰基金属有机框架等，这些都表现出良好的弛豫性能和磁共振性能，并且在磁共振协同的肿瘤诊断和治疗中具有转化和应用价值^[33, 34]。

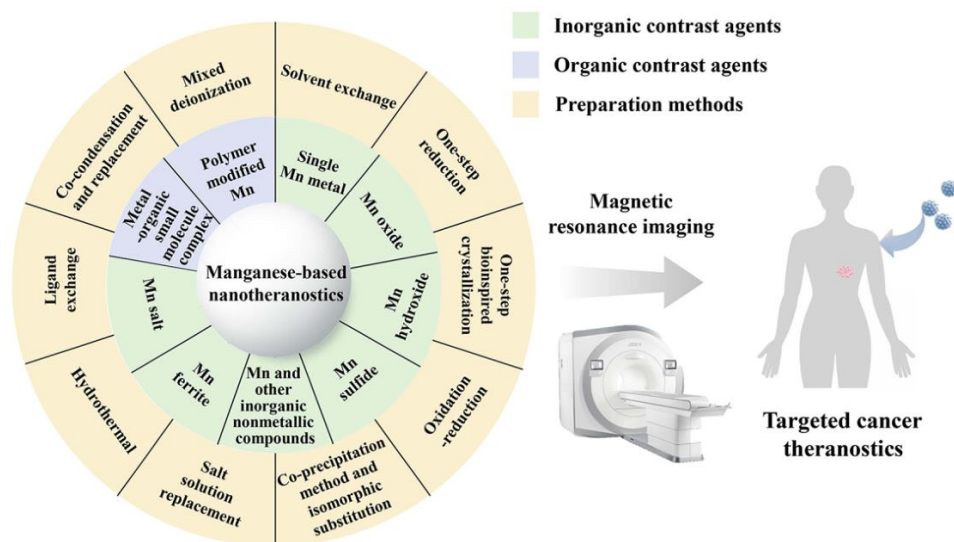


图 1-1. 锰基磁共振造影剂的分类、制备方法及其应用^[32]

Figure 1-1. Classification preparation methods, and applications of manganese-based magnetic resonance contrast agents^[32]

1.3.1 氧化锰纳米颗粒

研究发现，在众多的无机纳米材料中，锰氧化物纳米颗粒由于具有优异的顺磁性，能够改变核磁信号，用于磁共振成像检测，从而增加图像对比度。此外，锰氧化物纳米颗粒价格廉价，而且有很好的生物相容性和独特的催化能力，使得它逐渐在纳米材料中崭露头角，成为 MRI 造影剂和纳米载药材料的研究重点。锰氧化物纳米材料及其衍生物普遍作用于生物成像、生物传感、辅助药物、基因递送和肿瘤免疫等方面。锰元素很容易形成多种小分子有机物形成磁性络合物，而且也很容易与氧结合，形成 MnO 、 Mn_3O_4 、 Mn_2O_3 和 MnO_2 和 MnO_x 等锰氧化物，其中锰分别以 +2、+2/+3、+3 和 +4 价态存在。Na 等^[35]人通过油酸锰的热分解，合成制备了具有高均匀性的胶体 MnO 纳米颗粒，用于磁共振成像。通过热分解的方式生成了具有单分散性和分别为 7、15、20 和 25 nm 的粒径颗粒，这些颗粒在 3.0 T 场强下的 r_1 弛豫率分别为 0.37、0.18、0.13 和 0.12 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。此后更多的人对氧化锰进行更深入的研究，从而以得到合适的造影剂。其中，通过改变锰源、溶剂种类、合成方式等可以合成各种形态不同的锰氧化物纳米颗粒（MONS），例如中空介孔结构、实心球状结构、纳米棒、纳米带、纳米管等。众所周知，材料的结构性能受到其结构影响，这进一步决定了材料的未来应用。不同的制备方式对产物的尺寸、形貌、弛豫性能有直接影响。

研究发现空心的氧化锰纳米颗粒 (HMON) 由于其较大的比表面积, 能够有更高的载药量, 而且空心氧化锰纳米颗粒相对实心氧化锰纳米颗粒来说具有更高的 r_1 弛豫度, 更加有利于 MRI 造影剂的合成。Shin^[36] 等将 MnO 纳米粒子在酸性溶液中长时间直接蚀刻, 去除 MnO 核, 制备出了空心氧化锰纳米颗粒, 材料的自旋弛豫大大提升。然而 MnO 纳米颗粒可能被网状内皮系统捕获, 大量蓄积于肝、脾, 随着 Mn^{2+} 的缓慢释放, 可能产生潜在的毒性而且大多数锰的氧化物造影剂可能在水介质中不够稳定, 导致不能很好的发挥成像作用。为了能够降低生物毒性, 发挥出更好的作用, 研究者们发现在锰氧化物的表面涂覆/修饰有机和无机分子, 可以有效地解决这一问题。其中最常见的表面涂层是聚乙二醇^[37]、多巴胺^[38]、和二氧化硅^[39]。此外, 其中一些分子具有一定的刺激反应性, 并被引入造影剂中, 通过对不同的生理或病理刺激做出反应来增强对比信号^[40]。聚乙二醇化双磷酸树突 (PDns) 附着在 MnO 表面, 较小的 MnO 纳米颗粒在 T1 加权 MRI 中产生了更亮的信号 ($r_1 = 4.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $r_2 = 37.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) 并且具有较好的快速排泄能力, MnO 纳米颗粒最终通过粪便、尿液排泄等形式排除^[41]。Peng 等^[42] 发现将 SiO_2 包裹的氧化锰纳米颗粒与乙酸乙酯化合物在碱性条件下的相结合, 并将反应温度控制在 60°C 的情况下反应几小时, 能够制备出具有介孔结构的新型纳米材料, 介孔结构可以使水分子能轻松的通过材料表面的孔洞与 MnO@mSiO_2 表面发生相互作用。研究团队在此技术上继续研究, 研究发现通过采用类似的实验条件, 合成的材料结构发生了变化, 其中原本实心的 MnO 核被刻蚀, 变成了具有中空结构的 H-MnO@mSiO₂ 纳米材料。这种改变不仅仅能够使得纳米颗粒具有较好的载药性, 而且能够进一步提高 r_1 弛豫率。结果显示 SiO_2 包覆的 MnO NPs、介孔 MnO@mSiO_2 和中空的 MnO@mSiO_2 的 r_1 弛豫率分别为 0.07、0.16 和 $0.2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。胡^[43] 等人使用逐层静电组装在 MnO 纳米颗粒上包覆聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), MnO@PVP 纳米颗粒可以穿过血脑屏障, 并随着血流逐渐代谢到其他部位, 使得血管内具有核磁信号 ($r_1 = 1.937 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $r_2 = 27.879 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 3.0 T) 并且在基础神经科学研究中具有一定的潜在应用。

1.3.2 锰掺杂的纳米颗粒

除了氧化锰纳米颗粒的发展外, 锰离子也被掺入其他类型的无机纳米颗粒中。目前大多锰离子主要是掺入在氰桥配位网络中, 如普鲁士蓝纳米颗粒^[44]、锰离子在纳米金刚石表面的接枝^[45, 46]以及掺杂锰的碳点的发展^[47-49]。陶^[50] 等人通过微乳液法制备了掺杂 Mn 的普鲁士蓝纳米粒子 (MnPB NPs)。MnPB 纳米颗粒在体外

和体内都表现出优异的 T1 和 T2 加权磁共振成像增强。结合磁共振成像和癌症治疗,侯^[51]等人开发了一种掺入一氧化氮和免疫激动剂 R848 的锰掺杂的介孔多巴胺纳米药物,通过释放丰富的 Mn^{2+} 使得具有高灵敏度的 T1-T2 双模 MRI 用于检测纳米药物的肿瘤积累过程。在关于掺杂锰的碳点系统的研究中,由于碳纳米点是发光的,因此也可以实现在光学成像中检测到信号。通过将锰离子与不同的纳米支架相结合,可制备出不同于氧化锰纳米材料的锰基纳米探针。锰金属属于过渡金属,具有一定的酸响应行为。例如 Mi^[52]团队研究并报道了合成的掺杂锰的磷酸钙纳米颗粒(PEG-MnCaP)具有一定的酸响应性能。PEG-MnCaP 能够在酸性环境下分解并释放出 Mn^{2+} , 释放出来的 Mn^{2+} 又能进一步与蛋白结合,这种方式能够使得在 pH 为 6.5 条件下弛豫效能进一步提高, r_1 值由原来的 $4.73 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 升高至 $19.96 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 从而实现肿瘤酸性环境响应增强的 MRI。从此看来,掺杂锰的纳米材料不仅仅是一种理想的 TME 响应材料,而且可以实现 TME 的正向调节,而且还可以作为一种影像引导协同多种治疗手段达到杀肿瘤的作用。

1.3.3 锰络合物和锰基金属有机框架

除了探索锰的氧化物及其掺杂锰的纳米颗粒以外,锰还可以和金属或者其他化合物进行配位,形成锰的络合物。配位化合物是一类由中心原子(或离子)与其周围的分子(配体/配体)通过配位键完全或局部地连接在一起而构成的一类有机体,它是一类特殊的物质。目前络合物形成技术广泛应用于金属离子基铸造材料的制备^[53]。其中,金属-有机框架(MOFs)是一类以金属中心或含金属簇为配体,通过配位化学键合作用,逐步构筑出一系列有序、局部网状相连的多孔三维晶态材料。这种无机/有机杂化材料表现出优异的性能,这归功于其高的比表面积、可调节的尺寸和孔隙率以及易于表面改性。锰基金属有机框架材料(Mn-MOFs)是一类独特的金属有机框架材料,具有低毒性、低氧化能力和生物相容性的特点。这类金属有机框架材料在化工、医学、生物领域的应用中充当着重要角色,发挥着显著的作用。Mn-MOFs 在生物医学领域具有巨大的优势^[54, 55]。

Figure 1-2. (a) Applications of Manganese organic skeletons and manganese complexes in biomedical fields; (b) proportions of different biomedical applications^[55]

锰是人正常机体必须的微量元素，锰络合物和锰基金属有机框架 Mn-MOF 具有生物相容性，在体内具有很好的稳定性，能够用来作为药物载体。由于锰是顺磁性金属，作为造影剂具有较强的弛豫增强作用。研究还发现锰络合物以及 Mn-MOFs 具有较强的氧化还原活性，利用 pH 值和氧化电位作为成像触发器，在

改善和辅助肿瘤治疗的同时能够实现对肿瘤微环境的特殊响应，与其他过渡金属系相比，已得到了广泛的研究。

1.4 锰基纳米材料探针在肿瘤诊断和治疗中的应用

随着科学技术的发展和人们生活水平的提高，癌症的诊疗方式也越来越丰富。其中，生物医学影像学成像对疾病检测是十分重要的。锰基纳米材料借助优越的声、光、电、磁等特性为肿瘤敏感且可靠诊断提供了独特的新途径。锰基纳米材料也具有一定的抗肿瘤特性，锰基纳米颗粒或抗癌药物和医学影像技术相结合可以跟踪药代动力学过程，对疗效进行实时监控。此外，锰基纳米材料还可用于可视化 and 量化药物递送系统的行为，以满足不同的需求。例如，它们可以用于研究纳米载体的药物代谢和生物分布、药物释放过程以及纳米载体的代谢反应。

目前，构建肿瘤诊疗一体化纳米探针是一种新兴的生物技术，相比于传统的肿瘤治疗方案，构建诊疗一体化纳米探针能够实现肿瘤早期的筛查并进行诊断治疗，从而实现早发现早治疗，提高患者的生存率。诊疗一体化纳米探针一方面可以靶向定位微小的病灶组织及时对疾病做出诊断，另一方面纳米颗粒和抗癌药物结合可以实现精准治疗并减轻毒性作用。

1.4.1 锰基纳米材料的成像性能

纳米生物医学影像可分为光学成像、超声成像、光声成像、PET 成像、CT 成像、核磁共振成像以及多模式成像等，其中较为理想的是磁共振成像技术。锰基纳米材料中通常是锰离子来实现材料的 MR 成像作用，但随着临床的需求，研究者在固有磁共振成像的基础上增加了其他成像能力，形成了一种多功能分子成像探针，以满足多角度、多模态的成像需求。通过结合不同成像技术的优势，复杂的生化过程，使得可以在活体中精细、特异、无创地显示，从而提高对疾病的监测和诊断能力。不同的成像模式具有不同的成像特性，可以同时反应靶区和正常组织多维维度信息，充分实现了 1+1>2 的诊疗效果。例如在 Mn-MOFs 中引入具有高 x 射线光子衰减能力的阳离子 Rb 或 Cs，可以使其成为强大的 x 射线对比剂，从而能够保持其固有的成像能力^[63]。Mn²⁺离子也可以与具有特定功能的有机材料结合，形成具有多种成像功能的材料，如有研究将 Mn²⁺离子与近红外(NIR)染料结合，形成具有 MR 成像和 PA 成像的 MOFs^[64]。刘等人利用简单水热法成功制备了平均直径为 31 nm 多功 CuS@MPG 纳米复合物，所制备的超小纳米颗粒

表现出优异的光热效应和光声活性。同时，高负载量的 Mn^{2+} 配合物赋予了纳米颗粒良好的核磁成像性能，显著缩短了水相中质子的纵向弛豫时间，是一种极具潜力的 T1 对比剂。活体光声成像（Photoacoustic Imaging, PAI）结果显示，纳米颗粒在系统给药后 24 h 内可有效积累在肿瘤部位，MRI 进一步验证了这一点。随后在体内对癌症进行光热治疗，没有引起任何观察到的副作用（图 1-3）。

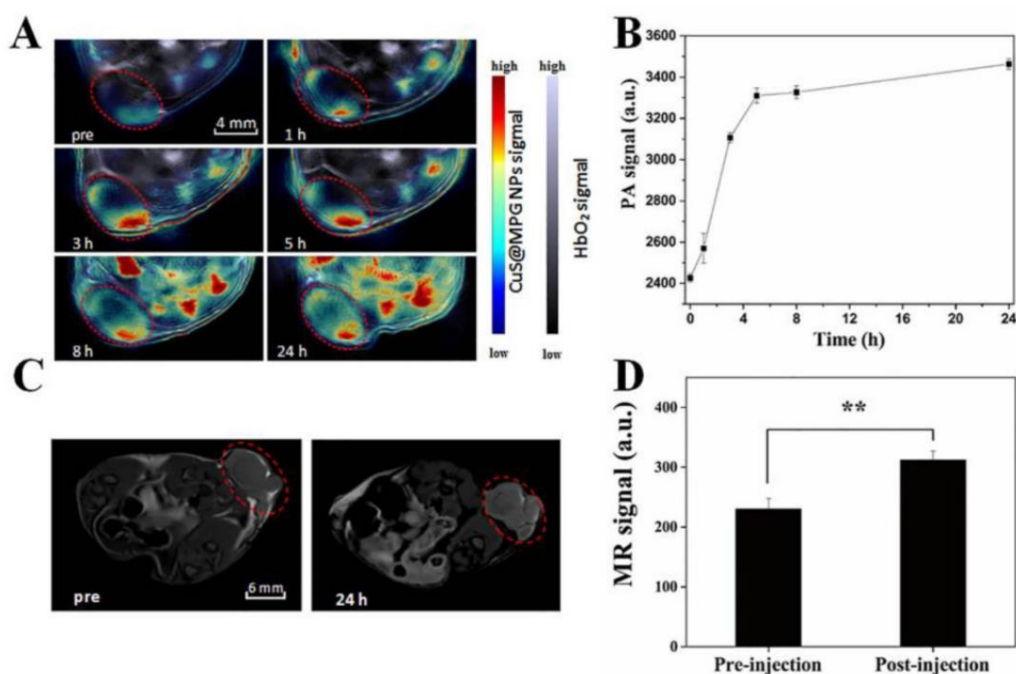


图 1-3. (A)应用 MOST 成像系统采集静脉注射 CuS@MPG NPs 前及注射后不同时间点^[65]（1 h、3 h、5 h、8 h、24 h）的 PA 图像；（B）肿瘤区域的 PA 信号注射后时间的函数；（C）静脉注射 CuS@MPG NPs 前和注射后 24 小时的 T1 加权 MRI 图像；（D）注射前和注射后 24 h 肿瘤区域的 MR 信号（ $P < 0.05$ ，t 检验）

Figure 1-3. (A) The MOST imaging system was applied to acquire PA images before intravenous injection of CuS@MPG NPs and at different time points (1 h, 3 h, 5 h, 8 h, 24 h) after injection^[65]; (B) PA signals in the tumor area as a function of time after-injection; (C) T1-weighted MRI images 24 hours before and after intravenous injection of CuS@MPG NPs; (D) MR signals in the tumor area before and 24 h post-injection ($P < 0.05$, Student's t-test).

除了 MRI 和光学成像，近红外光，荧光成像外，其他成像类型的结合也得到了许多研究人员的积极研究。Yang 等描述了通过阳离子交换方法制备了具有核壳结构和共掺杂结构纳米金属有机粒子（NMOPs）Mn/HF-IR825，其表面包被聚多巴胺，再与聚乙二醇结合，用于癌症的多峰成像^[66]。构建多组分 Mn/Hf-IR825 @PDA-PEG 多功能纳米平台，用于 MRI/PA/CT 三模态成像引导下的肿瘤 PTT 和

RT 联合治疗。实验表明 Mn/Hf-IR825@PDA-PEG 的 T1WI 图像显示出浓度依赖性的增亮效应。NMOP 相应的 r_1 值为 $7.28 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，高于 Mn 和使用钆基造影剂的品种 ($4.25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)。静脉注射 NMOP (10 mg kg^{-1}) 24 小时后，在 4 只携带 4T1 肿瘤的小鼠的肿瘤中显示出显著的 T1 加权磁共振信号，表明通过增强的渗透能力和滞留效应，NMOP 在肿瘤中显著聚集(图 1-4a)。小鼠注射 NMOP 后 24 h，肿瘤有效地吸收了纳米颗粒，表现出较强的 CT 对比度。随后，肝脏内的造影剂也增加了，表明纳米颗粒留在肝脏内，并负责将外来的 NMOP 从循环中清除(图 1-4b)。此外，IR825 在 NMOP 中也具有较强的近红外吸收率，可作为一种有效的对比剂用于光声成像，静脉注射后 24 小时，肿瘤区域的 PA 信号显著增加，而在未注射 NMOP-PEG 的肿瘤中，初始的 PA 信号相当弱(图 1-4c)。Bao^[67]团队成功制备了能够应用到三种成像模式的纳米材料 FA-Hf-Mn-NMOF (FHMnM)，实现 MRI/PA/CT 成像技术相结合的。实验结果表明，合成的 NMOF 具有成为高效 MRI 阳性对比剂的潜力，其中叶酸修饰的 FHMnM 具有良好的靶向成像能力。钆对 x 射线表现出高度衰减效应，随着 x 射线辐射的增加，在体外实验中不同浓度的 Hf-MnM 均表现出 CT 成像的感知能力，而在临床 CT 对比剂和酒精碘中，随着钆或碘浓度的增加，两种样本均表现出 CT 对比增强。FHMnM 的 CT 衰减效率是碘海醇的 1.7 倍。同样，光声成像结果也很好(图 1-4d)。在 S180 荷瘤小鼠经尾静脉注射 $200 \mu\text{L}$ 的 FHMnM 材料前后进行体内磁共振成像实验(图 1-4e)。与注射前相比，两种纳米颗粒在注射后的 T1 加权图像上显示出显著的肿瘤增强，并且 FHMnM 在肿瘤区域显示出显著更高的磁共振信号强度。因此，FHMnM 是 MRI/CT/PAI 三模成像的良好对比剂，在肿瘤的诊断和治疗中具有重要作用。

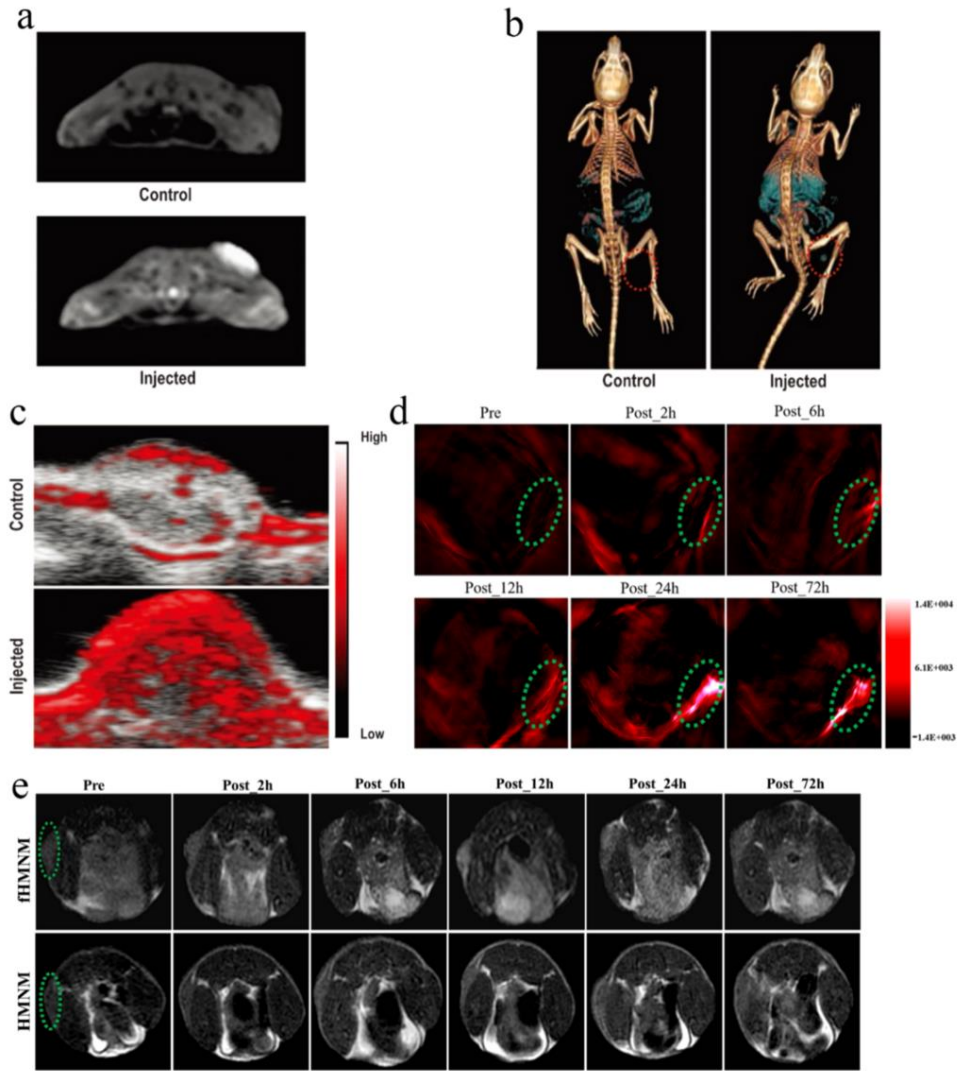


图 1-4. (a) 荷瘤小鼠静脉注射 NMOP-PEG 前和注射后 24 小时的 CT 图像；(b) 荷瘤小鼠静脉注射 NMOP-PEG 前和注射后 24 小时 PA 图像；(c) 静脉注射 NMOP-PEG 前和注射后肿瘤区^[66]的 PA 图像；(d) 注射后不同时间点 (0, 2, 6, 12, 24, 72 h) 荷瘤小鼠 PAI 图像绿色的圆圈突出显示肿瘤区域^[34]；(e) 两种样本的体内的 MR 比较。绿色的圆圈突出显示了肿瘤区域 (每组 $n = 3$) ^[67]

Figure 1-4. (a) CT images of hormonal mice before and 24 h after intravenous injection of NMOP-PEG; (b) PA images prior to and 24 h following NMOP-PEG intravenous injection in hormonal mice^[66]; (c) PA images of the tumor area ^[66] before and after intravenous injection of NMOP-PEG; (d) PAI images of hormonal mice at different time points (0, 2, 6, 12, 24, 72 h) after injection. The green circle highlights the tumor area; (e) Comparison of MR *in vivo* for both samples. The green circles highlight the tumor areas ($n = 3$ per group) ^[67]

1.4.2 锰基纳米材料的抗肿瘤性能

恶性肿瘤一直严重威胁着人类的健康，其死亡率仅次于心血管疾病。目前，开发有效、安全、不良反应小的抗肿瘤药物是当前抗肿瘤研发的主要重点领域。抗肿瘤药物又称抗癌药物。目前研发的抗肿瘤药物主要通过调控细胞周期、信号转导、诱导细胞凋亡、诱导血管生成以及细胞与细胞外基质的相互作用来发挥抗肿瘤作用，具有高选择性、低毒等优点。这些抗肿瘤药物的主要作用机制包括：

（1）直接对肿瘤细胞进行杀伤作用，从而抑制肿瘤细胞增殖，促进细胞凋亡和坏死；（2）诱导肿瘤细胞分化，并不可逆地阻断肿瘤细胞分化；（3）阻断肿瘤侵袭转移；（4）抑制肿瘤血管生成等^[68]。顺铂及类似物作为一种强效抗癌药物被发现以来，金属类药物因其在癌症治疗中的各种应用而引起了研究者的兴趣^[69, 70]。但由于铂类药物对肾脏区域的损害、血液毒性和获得性耐药，限制了其临床应用^[71]。锰是正常人体必需的微量元素之一，具有良好的生物相容性。因此，锰基复合物在肿瘤治疗中具有低毒和高效的优点，锰基金属有机配合物具有优良的光活性、电性和磁性，以及更大的比表面积，是执行大量载药的有力候选对象。与此同时，可以设计多种具有不同官能团和可控药物释放的弹性可调节孔径和尺寸的不同生物分子，以避免副作用，具有良好的生物相容性，成分可以调和靶向递送药物的表面，具有易于修饰的优点^[72, 73]。它们构成了一类具有增强的渗透性和滞留效应（EPR）以及靶向性的纳米载体^[74]。

目前，化疗、光动力疗法（PDT）、声动力疗法（SDT）、光热疗法（PTT）、放疗（RT）、化学动力疗法（CDT）、气体疗法和基因疗法等已被应用于肿瘤的临床治疗。这些治疗方法对肿瘤细胞的生长都有一定的抑制作用。然而，临床研究发现通过使用单一的治疗方式对肿瘤细胞进行杀伤可能会导致一些问题的出现，如化疗药物易产生耐药性，缺乏特异性；传统光敏剂水溶性差、组织穿透性差、皮肤毒性大，限制了 PDT 的临床应用。肿瘤乏氧微环境（TME）和声敏剂的非特异性分布限制了 SDT 的有效性和应用。在 PTT 治疗过程中，由于辐射吸收产生的热量对皮肤有毒性，肿瘤周围的正常组织细胞可能会受到损伤。放射治疗可能引起肿瘤周围正常组织的损伤，且在乏氧环境下的杀伤效果不佳。化学动力治疗需要严格控制摄入或释放气体的分子量，控制不当可能会导致中毒风险或治疗效果受限。在肿瘤的治疗中，治疗周期长、毒副作用大、肿瘤复发率高等问题也限制了肿瘤治疗在临床上的发展。因此，寻找合适的联合治疗模式对提高疗效具有重要意义。将多种治疗方式整合起来有利于解决单一治疗所带来的局限性，并且

整合后的治疗模式能够使肿瘤治疗效果更上一层楼。若将放化疗和光热治疗相结合一方面不仅仅能够单独发挥出化疗药效抗癌效果，而且利用近红外激光照射使得材料产生局部高热，这些热量也能用于光热治疗，而且另一方面通过温度的升高也有利于放化疗药物的释放，对于免疫疗法来说，若能够使其实现机体内的免疫应答，由于免疫的记忆性，也可以更好地加强其治疗效果。联合治疗可以减少单独光热治疗时温度过高从而损伤健康组织，放射过程中剂量过大的一些问题，通过相互之间合理的调整，使得联合治疗达到最好的治疗效果。

光热增强化学动力学疗法已引起越来越多的关注，其中以锰基纳米平台为代表在联合治疗中发挥着很重要的作用。马^[75]等人开发了一种双功能 $\text{Bi}_{2-x}\text{Mn}_x\text{O}_3$ 纳米平台（图 1-5），能够实现在肿瘤微环境下触发光热疗法从而增强化学动力学疗法，用于肿瘤的协同治疗。少量 Bi 的掺杂调整了 $\text{Bi}_{2-x}\text{Mn}_x\text{O}_3$ 的光热和化学动力学性能，从而促进光热转换能力以及加速羟基自由基的产生。还原性 Mn^{4+} 的存在可以通过增加谷胱甘肽（GSH）的消耗来破坏肿瘤内部的氧化还原平衡，从而改善化学动力学效应。同时，温和的光热效应可加速激光照射后肿瘤区域 GSH 的消耗和羟基自由基的产生，从而促进化学动力学效应。

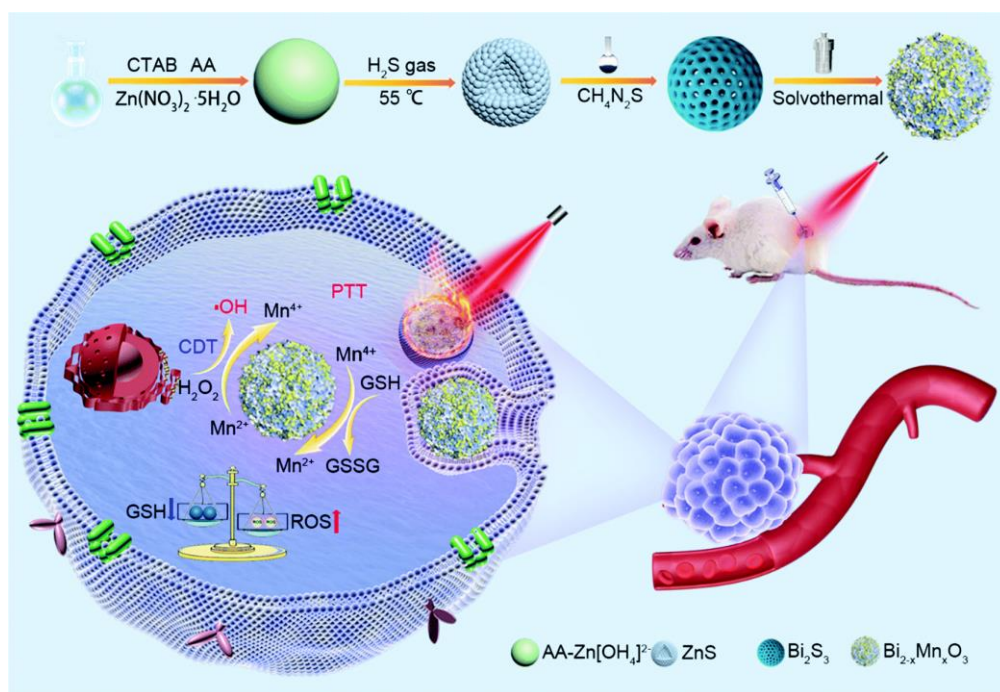


图 1-5. 用于联合 PTT-CDT 治疗肿瘤的 BM 示意图^[75]

Figure 1-5. A schematic representation of BM for combined PTT-CDT against tumors^[75]

抗肿瘤药物的释放在放疗方面是十分重要。林和他的团队^[76]研究了一种新型放疗增敏剂，该材料具有一定的光热性能，能够在近红外激光的照射下产生一定

的热量，进一步增强放疗材料对肿瘤的杀伤作用。通过与其他方式相结合，进一步优化了放疗效果。具体设计方案是装载具有近红外荧光 IR1061 染料与锰基氧化物 Janus 纳米离子发生自组装。自组装后的纳米颗粒具有谷胱甘肽响应性辐射，并且在谷胱甘肽的存在下，JNP 囊泡 (Ves) 解离成较小的金 (Au) NPs 和 Mn^{2+} ，可以通过消耗谷胱甘肽并通过类似芬顿作用反应触发化学动力学，从而增强放疗的功效。与此同时，由于 IR1061 染料在 NIR-II 窗口出具有一定的吸收，能够产生荧光作用，因此可以实现光声成像的检测。此外，纳米材料内的 Mn^{2+} 也具有一定的核磁弛豫，能够实磁共振成像检测。如图 1-6 所示，该纳米材料体系能够实现肿瘤的多模态（光声成像和磁共振成像）从而实现更高效的肿瘤杀伤。这种在多模态成像引导下成像模式和多种治疗方式相结合的诊疗平台有望成为治疗肿瘤疾病的新方式^[76]。

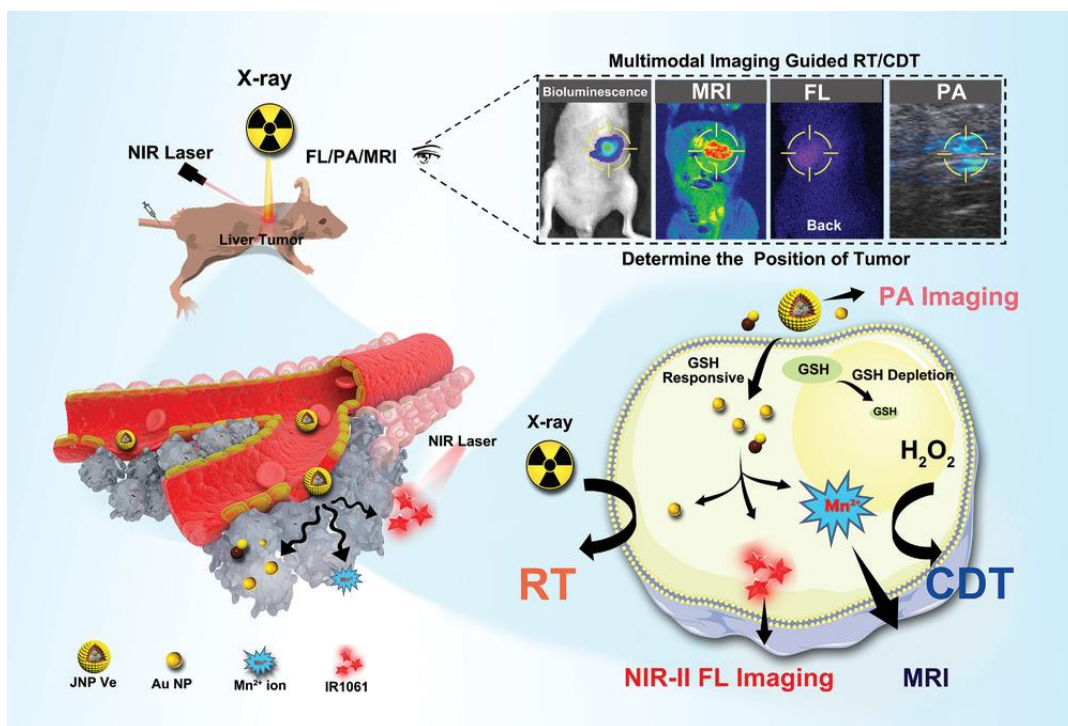


图 1-6. 用于联合 PTT-CDT 治疗肿瘤的 BM 示意图^[76]

Figure 1-6. A schematic representation of BM for combined PTT-CDT against tumors^[76]

综上所述，锰基纳米材料通过各种治疗方式相互协同，能够在肿瘤治疗中发挥重要的重用，而且作用优于单一治疗。此外，因为锰离子作用的纳米颗粒具有一定的成像性能，将锰离子应用于抗肿瘤研究中，不仅可以实现肿瘤的诊断还可以跟踪治疗过程和治疗效果、体内药物分布和监测药物对器官的毒性，更加有利于疾病的治疗。虽然许多研究已经证明了锰的氧化物、锰基配合物和锰基金属框能够很好的提高 MR 成像，提高图像对比度，利用荧光成像对解剖结构、病变区

域进行标记，提高癌症等疾病的诊断能力，而且能够通过构建纳米平台，与其他有机物和无机物的结合进行肿瘤的治疗应用，但是这些材料现在尚未满足临床要求，还未能应用到临床实践，仍然有一些问题需要克服。例如，纳米材料的制备过程复杂、成本高，阻碍了锰基材料的大规模生产；锰基纳米材料在体内的生物分布和药动学性质仍不确定，需要进行深入研究以确保生物安全性；因此，为了实现临床转化和早期癌症的诊断，锰基纳米材料的性能仍有很大的提升空间。

1.5 研究课题的提出与研究意义

癌症是世界上最严重的健康问题，也是致死的一个重要原因，而且癌症的死亡率近十年来还在一直增加，全球范围内癌症患者的数量依然十分庞大。因此，迫切需要开发出有效的癌症诊断和治疗的方式。目前，结合纳米粒子的光热治疗受到了广泛的研究，然而在治疗的过程中如何确保治疗效果达到最优，实时观测病灶情况就显得十分重要。如何实现在成像的引导下进行治疗还是一个有待研究的热点问题。因此，本课题利用在有机小分子没食子酸与锰离子进行配位，然后再使用聚多巴胺进行改性，从而获得了具有磁共振成像功能和光热治疗的多功能纳米诊疗剂——Mn-GA@PDA 纳米颗粒，从而实现磁共振成像下引导肿瘤进行光热治疗（图 1-7）。这个研究内容不仅仅拓宽了乳腺癌诊治的新路径，还为纳米颗粒在临床应用转化方面提供了更多的前景。

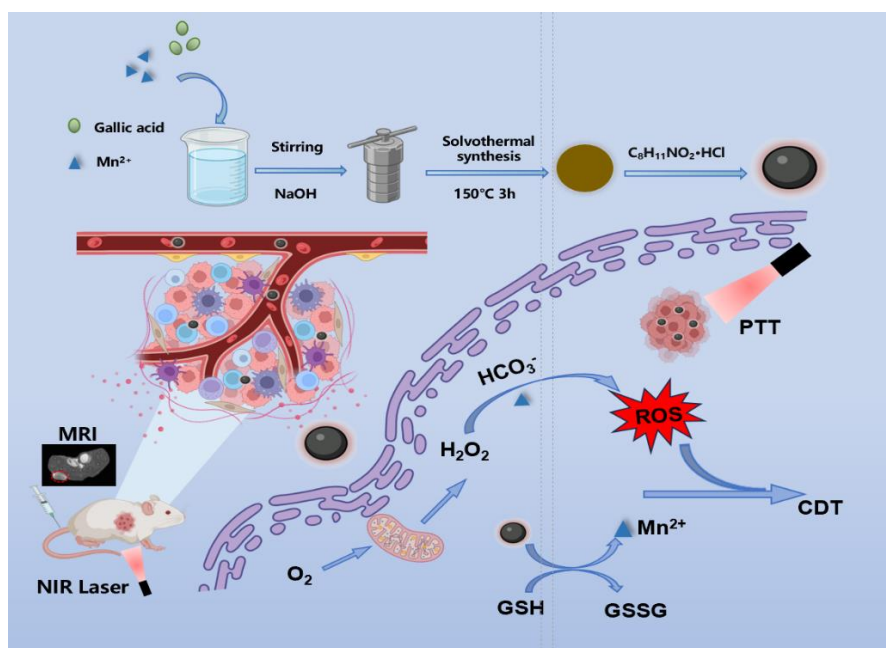


图 1-7. Mn-GA@PDA 纳米材料治疗肿瘤的示意图

Figure 1-7. Schematic representation of Mn-GA@PDA nanomaterials for tumor treatment

第二章 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的制备及性能表征

2.1 引言

锰基 MRI 造影作为一种优良的 MRI 对比剂在生物医学领域具有巨大的潜力和研究价值。与临床上广泛使用的 Gd 类造影剂相类似, 锰类造影剂也具有自旋量子数高、电子弛豫时间长等优点。此外, 作为一种人体必需的微量元素, 锰复合物在使用后能够通过肾脏排泄到体外。 Mn^{2+} 通常用做配合物的金属节点, 以达到更好的血管造影效果。更为重要的是, 研究发现与 Gd^{3+} 相比, Mn^{2+} 具有更高的电子自旋和更快的水交换速率, 这可能导致更大的弛豫速率, 具有较强的靶向性, 这可能有利于增强 MRI 图像的对比度。此外, 锰基纳米材料也可以被用作载体和其他物质结合, 实现多功能化, 如 MRI 介入的多模态成像引导肿瘤治疗, 因此锰可以当作当前 MRI 造影剂的替代品。

没食子酸 GA 是一种多酚类化合物, 具有低成本、低毒性、易获得、抗氧化活性、抗菌、抗病毒、抗炎等优点。据报道, 没食子酸对癌症、心血管疾病、肝病、炎症等多种疾病有效果。没食子酸的化学结构是由三个羟基和一个羧基包围的苯环组成, 分子另一侧的五个氧原子的可用性导致没食子酸是一种潜在的有机连接剂, 能够和金属离子发生配位。因此, 没食子酸小分子作为一种良好的金属配体, 在生物医学领域得到了广泛的研究。

聚多巴胺 (PDA) 是多巴胺或其他儿茶酚胺的最终氧化产物, 作为多功能涂层而备受关注, 可用于覆盖几乎所有材料的表面, 形成厚度范围从几纳米到约 100 纳米的可调保形层。聚多巴胺已被证明具有制备简单、光热转换效果好、生物相容性高、易于官能团化和粘附等优点。鉴于这些优点, 多巴胺被广泛应用于合成 PDA 纳米体系, 以获得出色的光热效应、优异的生物相容性和有效的药物载药能力, 因此, 在癌症和细菌感染治疗中的重要性日益突显。

本部分首先通过水热法一步使得没食子酸和二价锰离子发生配位作用, 生成没食子酸锰纳米颗粒, 然后研究了 Mn-GA 络合物在不同反应时间、反应温度下的生长情况, 并通过粒径、电位、透射电镜、场发射扫描电镜、X 射线光电子能谱分析等对其进行表征。再通过包覆修饰聚多巴胺形成稳定的纳米颗粒。本章介绍了 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的制备以及结构特征, 其中包括胶体的稳定性、作为 MRI 造影剂的性能、在 NIR 激光照射下的光热性能以及催化 H_2O_2 的能力。提出了一种基于多巴胺改性的 Mn^{2+} 和没食子酸 (GA) 配位构建的纳米颗粒用于肿瘤的诊断和治疗的新方法。

2.2 实验条件与实验材料

2.2.1 实验所需仪器设备

表 2-1. 纳米材料制备过程中的主要设备与仪器

Table 2-1. Main equipment and instruments in the preparation of nanomaterials

仪器名称	型号	生产厂家
恒温振荡摇床	ZHTY-50V	知楚仪器有限公司, 上海
电子天平	ISO9001	赛多利斯有限公司, 北京
pH/mV 计	MP512-03Meter	三信有限公司, 上海
超声波处理机	1500F-DZ	新芝生物科技股份有限公司, 宁波
水纯化系统	RODI-220AI	锐思捷水纯化技术有限公司, 厦门
ICP-MS	Icap6300	Thermo Fisher Scientific, 美国
涡旋振荡器	VORTEX-5	其林贝尔仪器制造有限公司, 江苏
近红外激光器	LR-MFJ-808	镭锐光电科技有限公司, 长春
红外热成像仪	Fluke Ti480U	福禄克测试仪器有限公司, 上海
磁力搅拌器	MS-H-S	SCILOGEX, 美国
冷冻干燥机	FreeZone2.5	LABCONCO, 美国
紫外分光光度计	UV-3600i Plus	岛津有限公司, 香港
傅里叶变换红外光谱仪	IS 50 FT-IR	Thermo Fisher Scientific, 美国
多功能酶标仪	MULTISKAN GO	Thermo Fisher Scientific, 美国
粒径电位分析仪	PSM-500	Thermo Fisher Scientific, 美国
透射电子显微镜	Tecnai G2 F20	FEI, 美国
X 射线衍射	X'Pert PRO MPD	Nalytical, 荷兰
X 射线光电子能谱仪器	Thermo Kalpha	Thermo Fisher Scientific, 美国
磁共振成像仪	Bruker Biospect7.0T	Bruker Biospect, 德国

2.2.2 实验所需试剂耗材

表 2-2. 纳米材料制备过程中的主要试剂与耗材

Table 2. Main reagents and consumable materials in the process of nanomaterials preparation

试剂名称	分子式	生产厂家
氢氧化钠	NaOH	阿拉丁试剂有限公司, 上海
没食子酸	GA	阿拉丁试剂有限公司, 上海
四水氯化锰	MnCl ₂ ·4H ₂ O	阿拉丁试剂有限公司, 上海
无水乙醇	C ₂ H ₅ OH	凌峰化学试剂有限公司, 上海
盐酸多巴胺	C ₈ H ₁₁ NO ₂ ·HCl	阿拉丁试剂有限公司, 上海
亚甲基蓝	MB	伊诺凯科技有限公司, 北京
磷酸盐缓冲液	1×PBS	湖北赛维尔生物科技有限公司, 湖北
过氧化氢	H ₂ O ₂	广东广试试剂科技有限公司, 肇庆

2.2.3 实验方法

1. Mn-GA 纳米颗粒的制备

将 0.5 mmol 的氯化锰 MnCl₂·4H₂O 溶解在 15 mL 的水溶液中, 搅拌 5 min, 然后再加入 0.5 mmol 的没食子酸 GA, 常温搅拌 30 min 至 GA 完全溶解。在整个反应过程中, 连续加入稀释的氢氧化钠水溶液 (2 M), 使反应溶液的 pH 值保持在 8.5~9.0 之间。然后将混合的溶液放入 20 mL 反应釜中, 在 150 °C 烘箱中反应 3 h。最后, 将所制得的试样进行离心处理, 然后用酒精洗 2 遍, 去离子水中洗 2 遍, 将沉淀物收集起来, 置于 -20 °C 冷藏, 然后置于冻干干燥器中 72 h, 得到干燥的待用产物。

2. Mn-GA@PDA 纳米颗粒的制备

在 250 mL 的烧杯中加入 100 mL, 10 mM Tris-HCl 溶液, 加入一定量的盐酸多巴胺再通过 2 M 的氢氧化钠使溶液 pH 调节至 8.5, 然后称量 10 mg Mn-GA 纳米颗粒粉末加入到烧杯中, 常温过夜充分搅拌, 然后用超声波处理机超声 10 min, 是颗粒充分分散。最后, 将所制得的试样进行离心处理, 然后用酒精洗 2 遍, 去离子水中洗 2 遍, 将沉淀物收集起来, 置于 -20 °C 冷藏, 然后置于冻干干燥器中 72 h, 得到干燥待用产物。

3. Mn-GA@PDA 纳米颗粒的基本表征

使用透射电子显微镜 (TEM, Transmission electron microscope) 用于检测和分析制备的纳米颗粒的大小和形貌结构。通过 PSM-500 型纳米激光粒度电位仪的动态光散射 (DLS, Dynamic light scattering) 测定水合动力直径, 通过电泳光散射 (ELS, Electrophoretic light scattering) 测定纳米颗粒的 Zeta 电位。取冻干的 Mn-GA 纳米颗粒粉末和 Mn-GA@PDA 纳米颗粒粉末 2 mg, 通过 Thermo Fisher Scientific IS 50 FT-IR 型傅里叶变换红外光谱仪分别获得纳米颗粒的红外光谱。使用 Thermo Kalpha 型 X 射线光电子能谱 (XPS, X-ray photoelectron spectroscopy) 对纳米材料的结构和元素进行测定。使用 X'Pert PRO MPD 型 X 射线衍射 (XRD, X-Ray diffractometer) 对纳米材料的晶体结构进行表征。

4. 弛豫率的测定

首先通过 ICP-MS 检测 Mn-GA@PDA 中锰离子含量, 然后将一系列不同锰浓度的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒水溶液的 0.5 mL 离心管放置在的磁共振成像仪 (Bruker Biospect) 上, 进行成像效果测试, 测量纵向和横向弛豫时间, 再通过对数据进行计算拟合得到其纵向弛豫率 r_1 和横向弛豫率 r_2 。

5. Mn-GA@PDA 纳米材料中锰离子释放

在不同 pH (5.0 和 7.4) 及其不同时间点 (0、2、4、6、8、10、12 h) 测定从 Mn-GA@PDA 纳米材料中释放的 Mn^{2+} 含量即在不同的时间点收集 Mn-GA@PDA 的上清液, 并补充等量的新鲜 PBS 溶液, 通过紫外分光光度计测定收集的上清的 Mn^{2+} 的含量。

6. Mn-GA@PDA 纳米材料的类芬顿反应活性检测

本实验中采用的亚甲基蓝染料 (MB, 蓝色) 被认为底物。在类芬顿反应的催化作用下 H_2O_2 形成 $\cdot OH$, 然后继续与 MB 发生复分解反应, 生具有氧化型 MB 的无色产物 (MBox), 使得亚甲基蓝原本的蓝色褪色, 通过此原理来检测 Mn-GA@PDA 纳米材料的催化活性。具体实验步骤如下: 在不同 pH 条件下, 先配 100 mL 的 0.1 mol L^{-1} 的醋酸钠水溶液。然后再用配好的 0.1 mol L^{-1} 的醋酸钠水溶液分别稀释 MB 溶液、 H_2O_2 、 $NaHCO_3$ 缓冲液以及不同浓度的材料浓度。在总体积为 2 mL 的 EP 管中分别加入 500 μL , 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的 MB 溶液、500 μL 不同浓度 (0、0.5、1、1.5、2 mM) 的 H_2O_2 溶液、500 μL 25 mM $NaHCO_3$ 缓冲液和 500 μL 不同浓度的 Mn-GA@PDA 纳米材料 (0、5、15、25、50、75、100 $\mu\text{g mL}^{-1}$),

37 °C条件下反应 30 min 后, 使用紫外分光光度计在 400 nm~800 nm 的波长范围内进行光谱扫描测定。MB 在 665 nm 处具有特征吸收峰, 通过测量 MB 在 665 nm 处的波峰强度变化来评估 Mn-GA@PDA 纳米材料的类芬顿反应活性。此外, 通过电子自旋共振 (Electron spin resonance, ESR) 检测羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 信号。

7. Mn-GA@PDA 纳米材料的体外光热性能评估

为了探究 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的光热性能, 我们将称量一定量 Mn-GA@PDA 纳米颗粒溶解在水介质中, 并使用超声仪器超声 10 min, 使之全部溶解。然后使用相同功率的近红外激光对不同浓度的纳米溶液进行光热升温曲线测定和光热稳定性测试。此外, 还研究了不同功率对同一浓度纳米材料的影响。配置的材料中 Mn-GA@PDA 纳米颗粒水介质系浓度梯度为 0、50、100、200、300、400、500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 将 808 nm 近红外激光的功率设置为 1.5 W cm^{-2} , 照射时长 10 min, 并且使用红外热成像仪每隔 30 s 记录一下当下的温度情况。配置 Mn-GA@PDA NPs 水分散系浓度为 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 将 808 nm 近红外激光功率梯度设置为: 1.0、1.5、2.0、2.5 W cm^{-2} , 照射时长 10 min, 并且使用红外热成像仪每隔 30 s 记录一下当下的温度情况。材料浓度 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 条件下, 808 nm 近红外激光功率设置为 1.5 W cm^{-2} , 以照射时长 10 min, 冷却时长 10 min 为一个循环, 反复进行 5 次循环, 并且使用红外热成像仪每隔 30 s 记录一下当下的温度情况。此外, 对照组 PBS 和 Mn-GA 纳米颗粒组也如同上操作进行光热性能测定。

2.3 结果与讨论

2.3.1 Mn-GA@PDA 纳米颗粒理化性能表征

将没食子酸水溶液和 Mn^{2+} 混合, 调节 pH 进行水热反应, 没食子酸的邻苯二酚基团具有很强的配位能力, 能够很迅速的结合 Mn^{2+} 。然而在实验过程中发现纳米颗粒在水或生物介质中分散性和稳定性比较低, 且光热性能较差, 不能够很好的在生物医学领域发挥作用。因此, 引入多巴胺作为一种表面稳定剂和光热剂用来提高纳米颗粒的稳定性和光热性能。通过研究水热反应在不同反应时间和不同反应温度下对纳米材料的影响, 我们发现在一定范围内, 纳米材料的形态具有一定的稳定性, 反应时间和温度对材料形貌改变不大 (图 2-1a 和 b)。

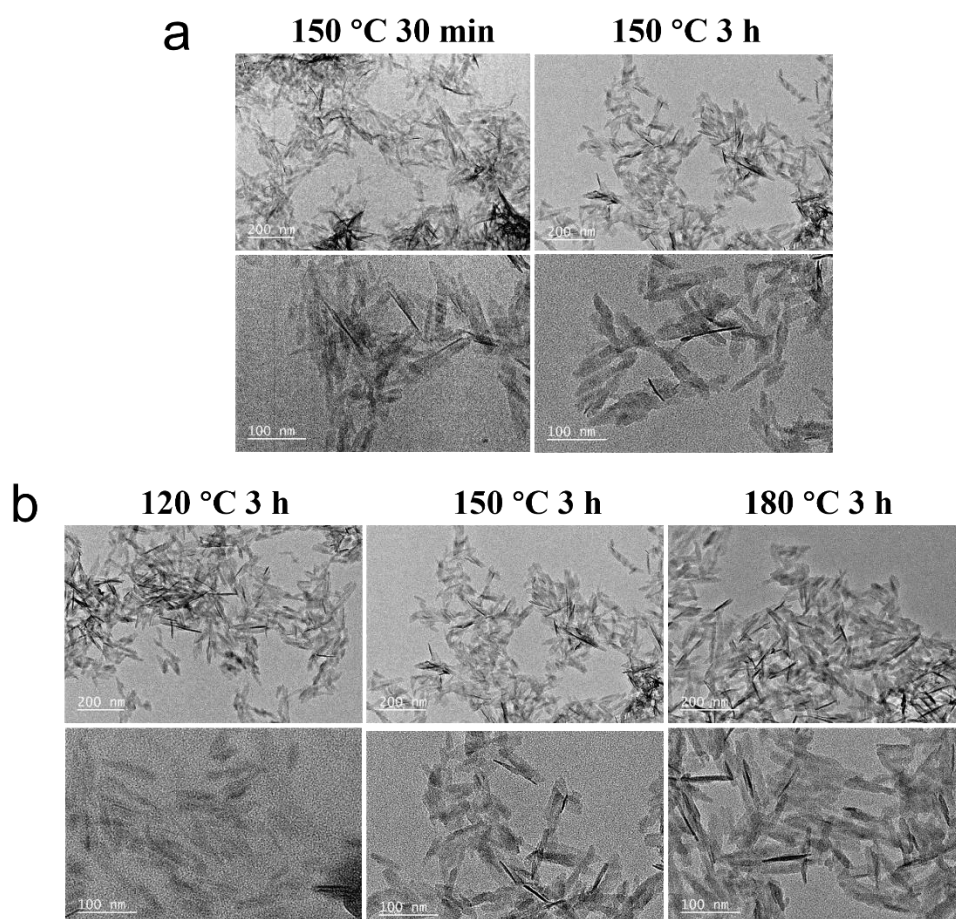


图 2-1. 不同反应时间和反应温度对 Mn-GA@PDA 纳米颗粒形貌的影响

Figure 2-1. Effect of different reaction times and temperatures on the morphology of Mn-GA@PDA nanoparticles

如图 2-2 所示为 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的 SEM、TEM、Mapping、表征结果。SEM 和 TEM 图像结果显示，水热反应生成的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒呈纳米颗粒形貌，具有良好的均一性，纳米颗粒尺寸约为长 100 nm，宽 20 nm，形如棒状（图 2-2a 和 b）。通元面扫对 Mn-GA@PDA 纳米颗粒进行元素组成分析，mapping 元素分析显示碳(C)、氮(N)、氧(O)s 和锰(Mn)元素都均匀分布于 Mn-GA@PDA 纳米颗粒中（图 2-2c）。

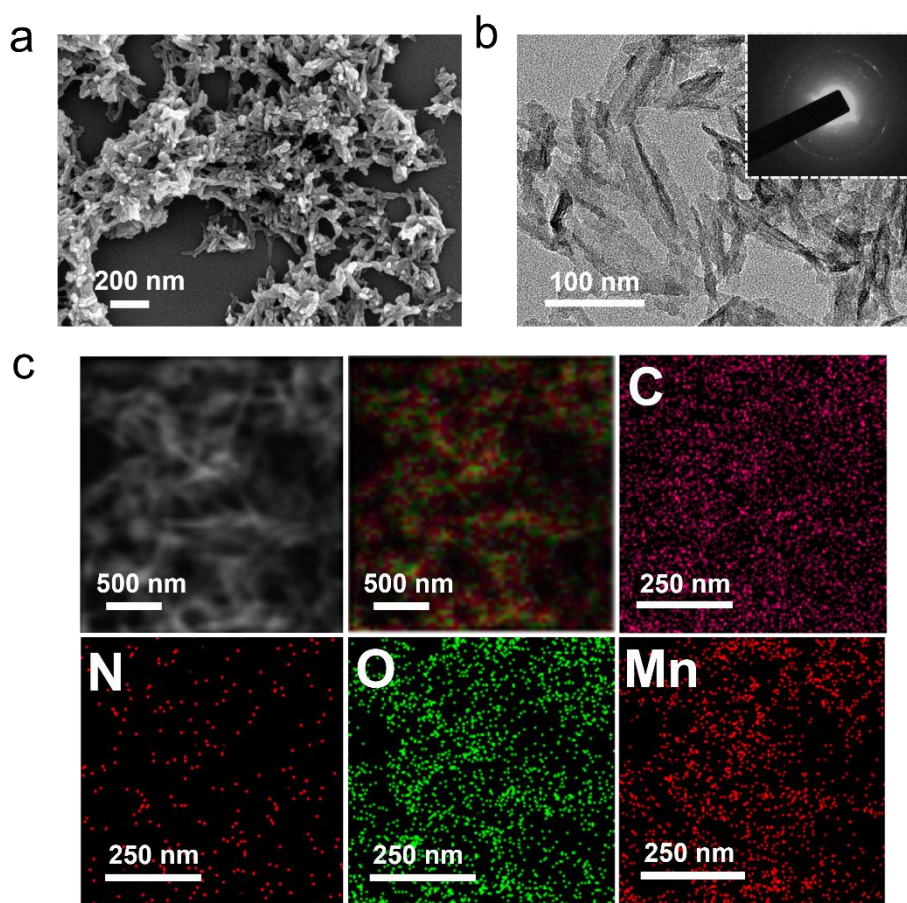


图 2-2. Mn-GA@PDA 纳米颗粒的理化性质表征结果：（a）Mn-GA@PDA 纳米颗粒的 SEM 图；（b）Mn-GA@PDA 纳米颗粒的 TEM 及电子衍射图；（c）Mn-GA@PDA 纳米颗粒的能谱分析元素面扫图

Figure 2-2. Characterization results of physicochemical properties of Mn-GA@PDA NPs. (a) SEM images of Mn-GA@PDA NPs; (b) TEM and electron diffraction patterns images of Mn-GA@PDA NPs; (c) HRTEM image of Mn-GA@PDA and corresponding elemental mapping distribution of C, N, O and Mn

此外，我们还对 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的红外光谱图、XRD、颜色数码照片、Zeta 电位、DLS 和 XPS 进行了进一步的分析。采用傅里叶变换红外（FTIR）光谱表征了 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的化学性质，没食子酸在红外光谱 3465cm^{-1} 处观察到了羟基的伸缩振动吸收峰，然而与锰金属离子配位后，该吸收峰消失，这揭示了没食子酸与锰离子成功进行螯合（图 2-3）。XRD 证明了合成的 Mn-GA@PDA 材料是一种无定形纳米材料（图 2-4）。

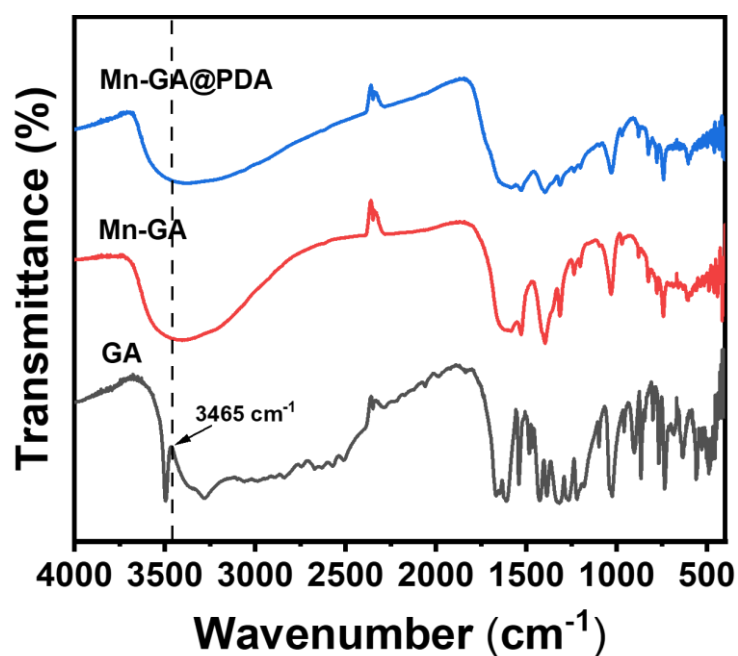


图 2-3. Mn-GA@PDA 纳米颗粒的傅里叶红外光谱图

Figures 2-3. FTIR spectra of Mn-GA@PDA nanoparticles

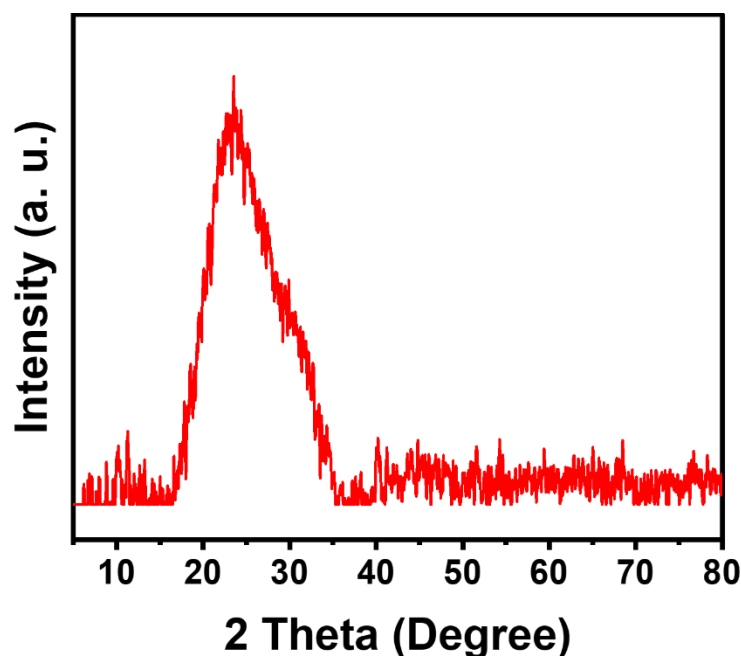


图 2-4. Mn-GA@PDA 纳米颗粒 XRD 图

Figures 2-4. XRD spectra of Mn-GA@PDA nanoparticles

采用 XPS 对纳米材料进行元素和价态分析也能证明氮和锰的存在，此外以 640.68 eV 为中心的特征峰为 Mn 2p_{3/2}，以 652.98 eV 为中心的特征峰为 Mn 2p_{1/2}，表明 Mn (II)物种占大部分，Mn (III)物种占少量。由于反应体系中只有多巴胺具有氮 (N) 元素，所以推断聚多巴胺成功修饰于没食子酸锰纳米片上，同时在同

一浓度下纳米材料的颜色由棕色变成黑色，进一步证明纳米颗粒在多巴胺的作用下发生改性（图 2-5）。

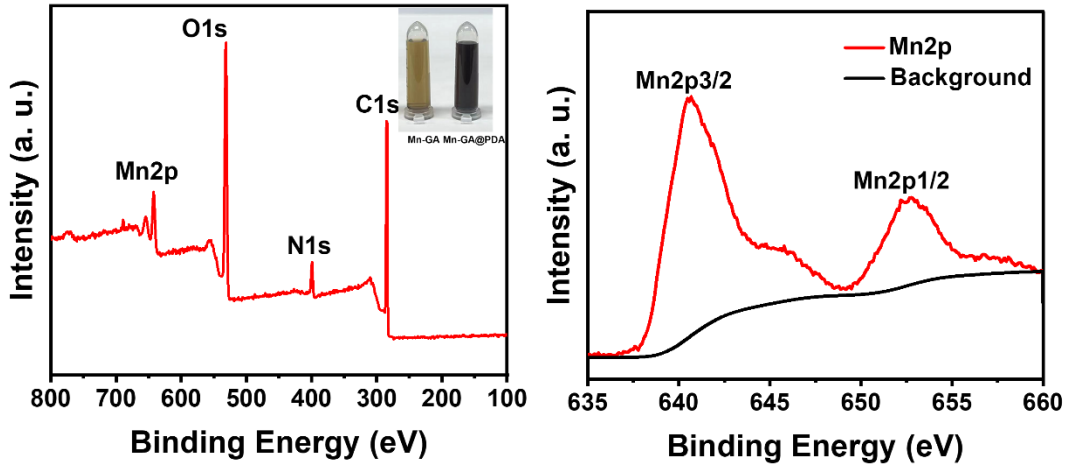


图 2-5. Mn-GA@PDA 纳米颗粒 XPS 图

Figures 2-5. XPS spectra of Mn-GA@PDA nanoparticles

结果显示 Mn-GA 纳米颗粒和 Mn-GA@PDA 纳米颗粒在水溶液中的 Zeta 电位分别为 -20.30 ± 0.68 mV 和 -26.43 ± 0.80 mV，表明其具有生物医学应用的可行性（图 2-6）。此外，通过水合粒径显示，纳米颗粒大小分布在 144.16 nm 左右，这与 TEM 图像中纳米颗粒尺寸相匹配。

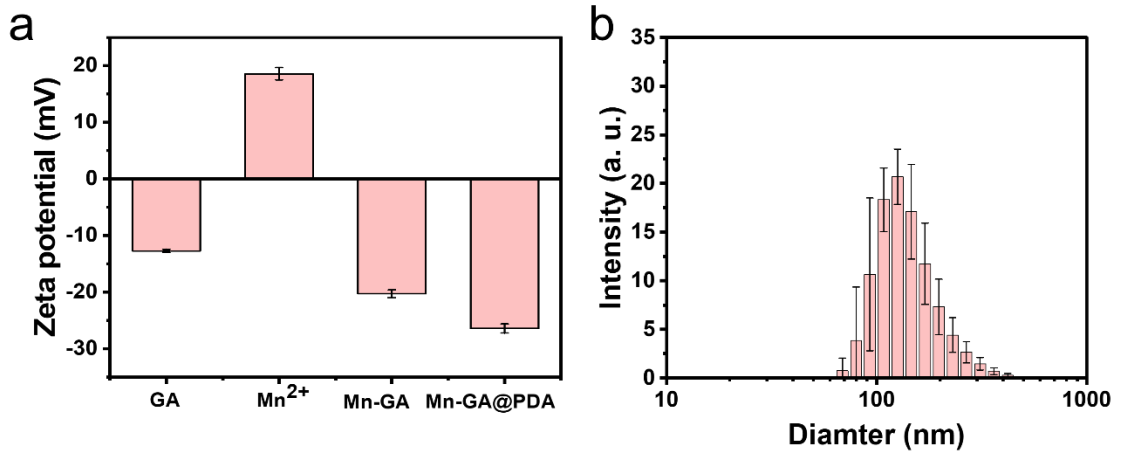


图 2-6. Mn-GA@PDA 纳米颗粒 Zeta 电位图和 DLS 水合粒径图

Figures 2-6. Zeta potential and the hydrodynamic diameter measured by the DLS of Mn-GA@PDA NPs ($n = 3$)

2.3.2 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的弛豫性能

用磁共振成像仪检测不同 pH (5.5, 7.4) 下 Mn-GA@PDA 纳米颗粒作为 MRI

造影剂的性能。实验结果显示如图 2-7 所示，经过体外核磁信号显示纳米材料具有一定的显影能力。对实验数据进行线性回归拟合，当 pH 为 5.5 时计算得到摩尔纵向弛豫率 $r_1=3.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ， $r_2=24.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；当 pH 为 7.4 时计算得到摩尔纵向弛豫率 $r_1=4.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ， $r_2=15.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。从此看来多巴胺负载的没食子酸是一种理想的肿瘤微环境响应材料，而且能够实现肿瘤微环境的正向调节，是一种理想的磁共振造影剂。

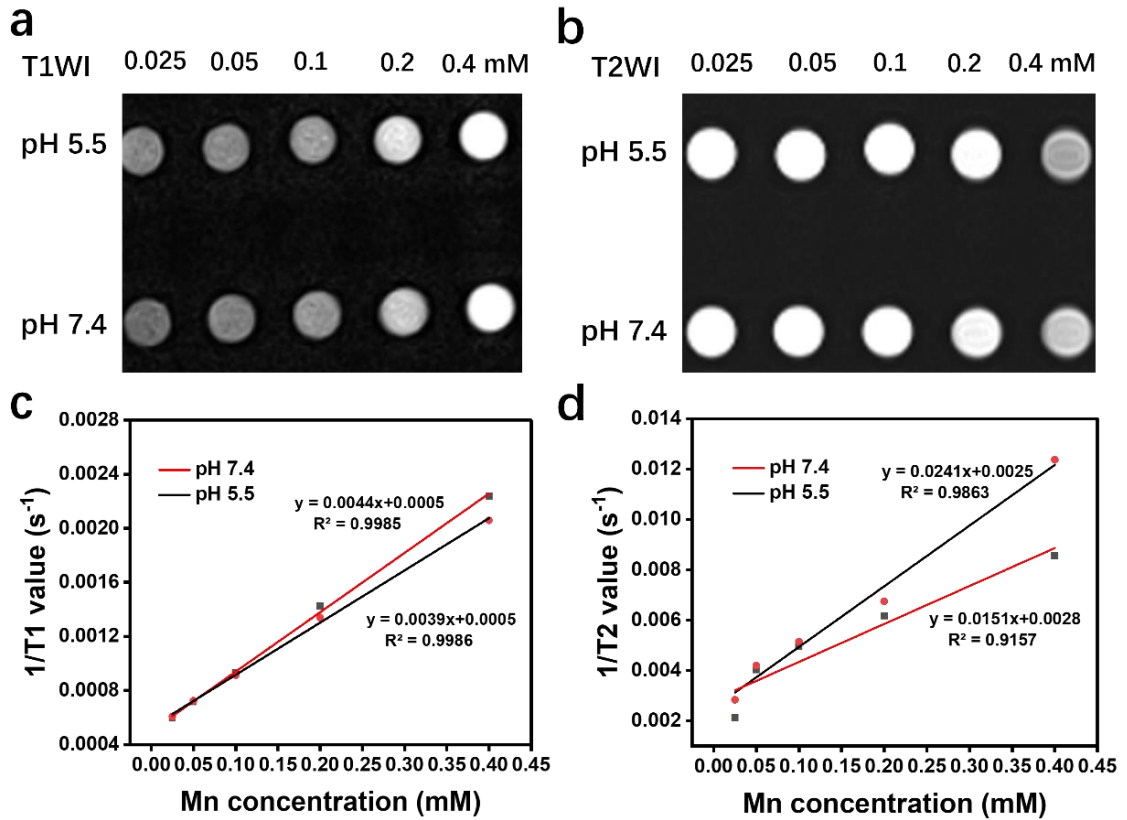


图 2-7. (a) 一系列含不同 Mn^{2+} 浓度的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的水溶液的 T1 加权 T2 加权 MR 图像；(b) 对实验数据进行线性回归拟合，提取纵向弛豫率 r_1 和横向弛豫率 r_2

Figure 2-7. (a) T1-weighted and T2-weighted MR Images of a series of aqueous solutions containing Mn-GA@PDA NPs with different Mn^{2+} concentrations; (b) Linear regression fitting was performed on the experimental data to extract longitudinal relaxation r_1 and transverse relaxation r_2

2.3.3 pH 触发 Mn-GA@PDA 纳米材料释放 Mn^{2+}

据相关文献报道，由于没食子酸和金属离子之间能够形成可逆配位键，这种配位键可以在酸性条件下断裂从而引发离子释放。因此，我们测定了在不同 pH 条件下 (5.5 和 7.4) 下 Mn-GA@PDA 纳米材料释放 Mn^{2+} 的能力。实验结果表明，在酸性条件下释放出来的 Mn^{2+} 达到 69% 左右，而在中性条件下只释放出 33% 左

右,酸性条件下的释放率是中性条件下的2倍左右。图2-8结果表明,Mn-GA@PDA 纳米颗粒中的 Mn^{2+} 能够在弱酸性的环境中得到快速释放。

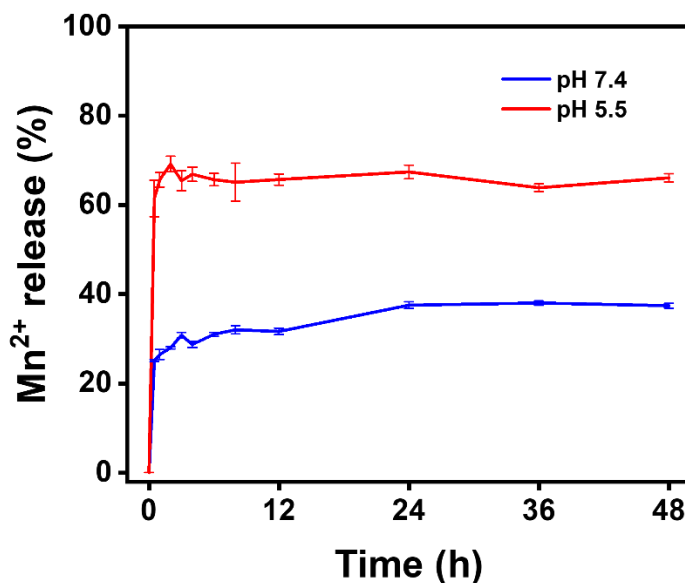
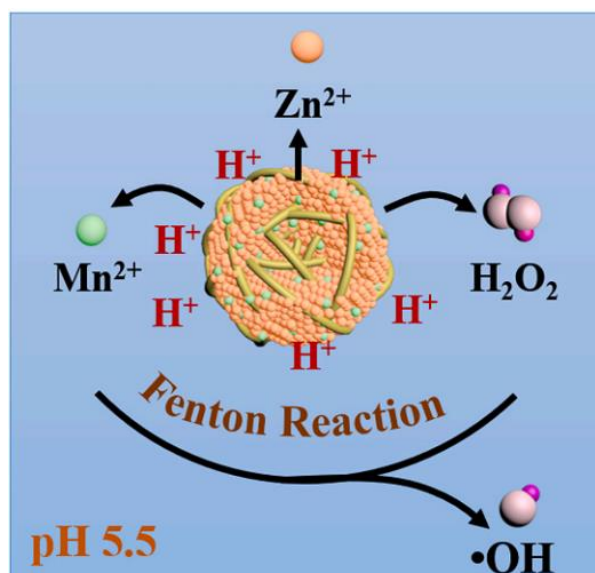


图 2-8. 不同 pH 值下 Mn-GA@PDA 纳米材料中 Mn^{2+} 的释放曲线

Figure 2-8. Mn^{2+} release curves of Mn-GA@PDA nanomaterials at different pH values

2.3.4 Mn-GA@PDA 纳米材料的类芬顿反应活性检测

芬顿反应,是一种无机化学反应,其反应过程是利用过氧化氢(H_2O_2)与二价铁离子 Fe^{2+} 反应,能够生成具有很强氧化性的羟基自由基。根据文献报道^[77-79],锰离子、锌离子、钴离子、铜离子等过渡金属离子也具有相似的能力,其原理和芬顿反应类似,能够催化过氧化氢生成羟基自由基,这个类反应称为类芬顿反应。制备合成的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒也是通过锰离子配位形成的,也能够通过催化 H_2O_2 产生羟基自由基,实现对肿瘤细胞的化学动力治疗。

图 2-9. 类芬顿反应产生羟基自由基的原理图^[80]Figure 2-9. Schematic diagram of hydroxyl radicals produced by a Fenton-like reaction^[80]

亚甲基蓝 (MB) 具有还原性, 很容易被羟基自由基氧化而生成还原态亚甲基蓝, 因此是检测芬顿/类芬顿反应的重要手段。为了进一步探究 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的催化活性, 研究采用亚甲基蓝作为羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的显色剂来定量或定性的检测羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的生成。实验结果图 2-10a 表明, 无论是在 pH 为 5.5 的酸性条件下还 pH 为 7.4 的中性条件下, Mn-GA@PDA 纳米颗粒都可以产生氧化性物质消耗亚甲基蓝, 亚甲基蓝色逐渐变浅, 在 665 nm 处的特征吸收峰都有明显的下降, 而且酸性条件下消耗的亚甲基蓝多于中性条件。为了进一步验证上述实验结果, 使用以 DMPO 作为自旋捕集剂的电子自旋共振 (ESR) 光谱测量对羟基自由基的产生进行检测, 结果显示 pH 5.5 和 7.4 的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒溶液的 ESR 光谱中均观察到 $\cdot\text{OH}$ 的典型峰强度为 1:2:2:1, 且酸性条件下的更为明显, 这表明 Mn-GA@PDA 纳米颗粒具有过氧化物酶样催化活性, 在 H_2O_2 存在下发生类芬顿反应产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基且在酸性条件下反应更为剧烈 (图 2-10b)。使用亚甲基蓝作为底物表征过氧化物酶样催化活性 MB 可被高活性的 $\cdot\text{OH}$ 氧化, 导致 MB 水溶液快都蓝色向浅色变化。通过对 Mn-GA@PDA 纳米颗粒不同浓度和溶液中不同含量的 H_2O_2 进行研究分析, 紫外可见光谱和光学数码照片所反应的结果一致都显示出 Mn-GA@PDA 纳米颗粒对 MB 的材料浓度和底物浓度依赖性催化活性 (图 2-10c 和 d)。综上所述, 本研究中 Mn-GA@PDA 纳米颗粒具有优异的 ROS 生成能力, 并有望应用于肿瘤的催化治疗。

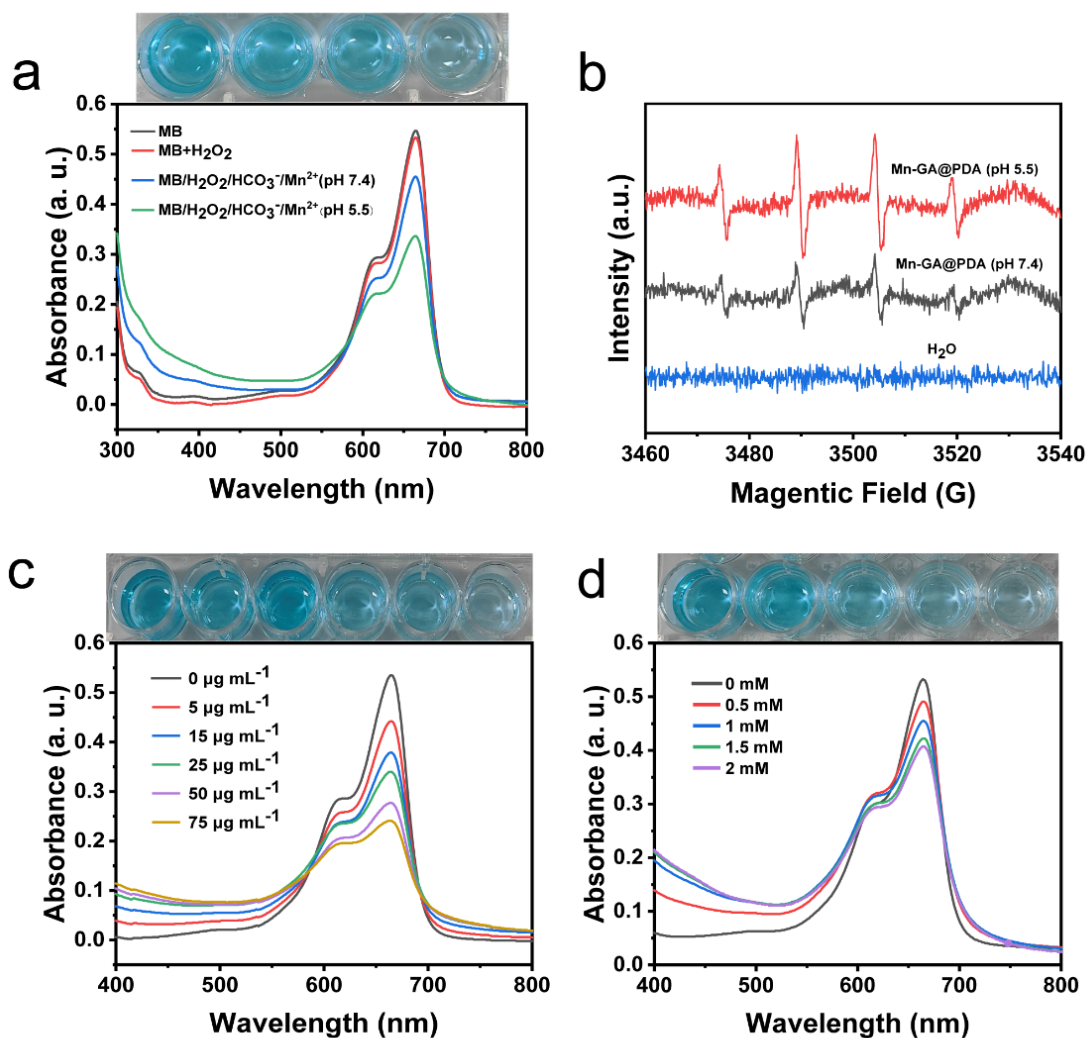


图 2-10. (a) 不同溶液 (MB, MB+H₂O₂, MB+H₂O₂+Mn-GA@PDA 纳米颗粒在 pH 7.4 或 5.5) 的光学照片和紫外可见吸收光谱分析结果; (b) 使用 DMPO 作为羟基自由基捕集剂, 在不同条件下 (pH 值为 7.4 或 5.5) Mn-GA@PDA-H₂O₂ 反应体系的电子自旋共振谱信号 (ESR); (c) 在 1 mM H₂O₂ 溶液中, 添加不同浓度 Mn-GA@PDA 纳米颗粒处理 MB 溶液后的光学照片和紫外-可见光光谱分析结果; (d) 在不同浓度 H₂O₂ 溶液中, 添加相同浓度 Mn-GA@PDA 纳米颗粒 (20 μg mL⁻¹) 处理 MB 溶液后的光学照片和紫外-可见光光谱分析结果

Figure 2-10. (a) Optical photos and UV-visible absorption spectrum analysis results of different solutions (MB, MB+H₂O₂, MB+H₂O₂+Mn-GA@PDA NPs at pH 7.4 or 5.5); (b) Electron spin resonance spectral signal (ESR) of the reaction system using DMPO as hydroxyl free trap under different conditions (pH 7.4 or 5.5) Mn-GA@PDA-H₂O₂; (c) Optical photos and UV-vis spectroscopic analysis results of MB solution treated with the same concentration of Mn-GA@PDA NPs in 1 mM H₂O₂; (d) Optical photos and UV-vis spectroscopic analysis results of MB solution

treated with the same concentration of Mn-GA@PDA NPs ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) in H_2O_2 solution with different concentrations

2.3.5 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的光热性能

多巴胺通常作为一种光热制剂使用，具有较好的光热吸收效。由多巴胺修饰合成的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒外光颜色呈黑色，因此 Mn-GA@PDA 纳米材料具有一定的光热活性的潜力。我们通过对 Mn-GA@PDA 纳米颗粒水分散系进行连续的 808 nm 近红外激光照射以评估其光热性能。如图 2-11a 所示，体外光热性能显示通过多巴胺改性材料后，材料的光热性能得到了很大的提升。在浓度为 $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ 和光热功率为 1.5 W cm^{-2} 时，材料组 Mn-GA@PDA 纳米颗粒水分散系的温度从 33°C 上升到了 51.5°C ，升温幅度为 18.5°C ，同等条件下 PBS 组的温度几乎没有变化。这进一步证明了通过聚多巴胺的改性，Mn-GA@PDA 纳米材料具有一定的光热升温性能。接下来我们对纳米材料在不同浓度梯度（0, 50, 100, 200, 300, 400, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ）以及不同功率梯度（1.0, 1.5, 2.0, 2.5 W cm^{-2} ）下的光热性能进行研究，实验结果表明在相同功率为 1.5 W cm^{-2} 的近红外 808 nm 激光功率强度下照射 10 min，温度随着纳米材料浓度的提高而逐渐提高。同时，通过记录不同照射时间点下的光热数码照片来进行证明稳定的上升变化（图 2-11b 和 f）。在纳米材料浓度为 $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时，随着近红外 808 nm 激光功率强度的不断增强，光热升温效果也逐渐提升（图 2-11c）。对 Mn-GA@PDA 纳米颗粒水分散系进行单次激光照射/关闭，得到纳米材料的光热冷热单循环图。为了证明 Mn-GA@PDA 纳米颗粒水分散系具有优异的光热稳定性，我们对材料进行了 5 次光热稳定性测试（激光照射/关闭循环实验），结果并未发现其温度曲线发生明显变化（图 2-11d 和 e）。综合上述结果，Mn-GA@PDA 纳米材料具有一定的光热性能和良好的光热稳定性，具备成为光热制剂的潜力，并具有作为可靠的光热响应剂用于 PTT 肿瘤消融的巨大潜力。

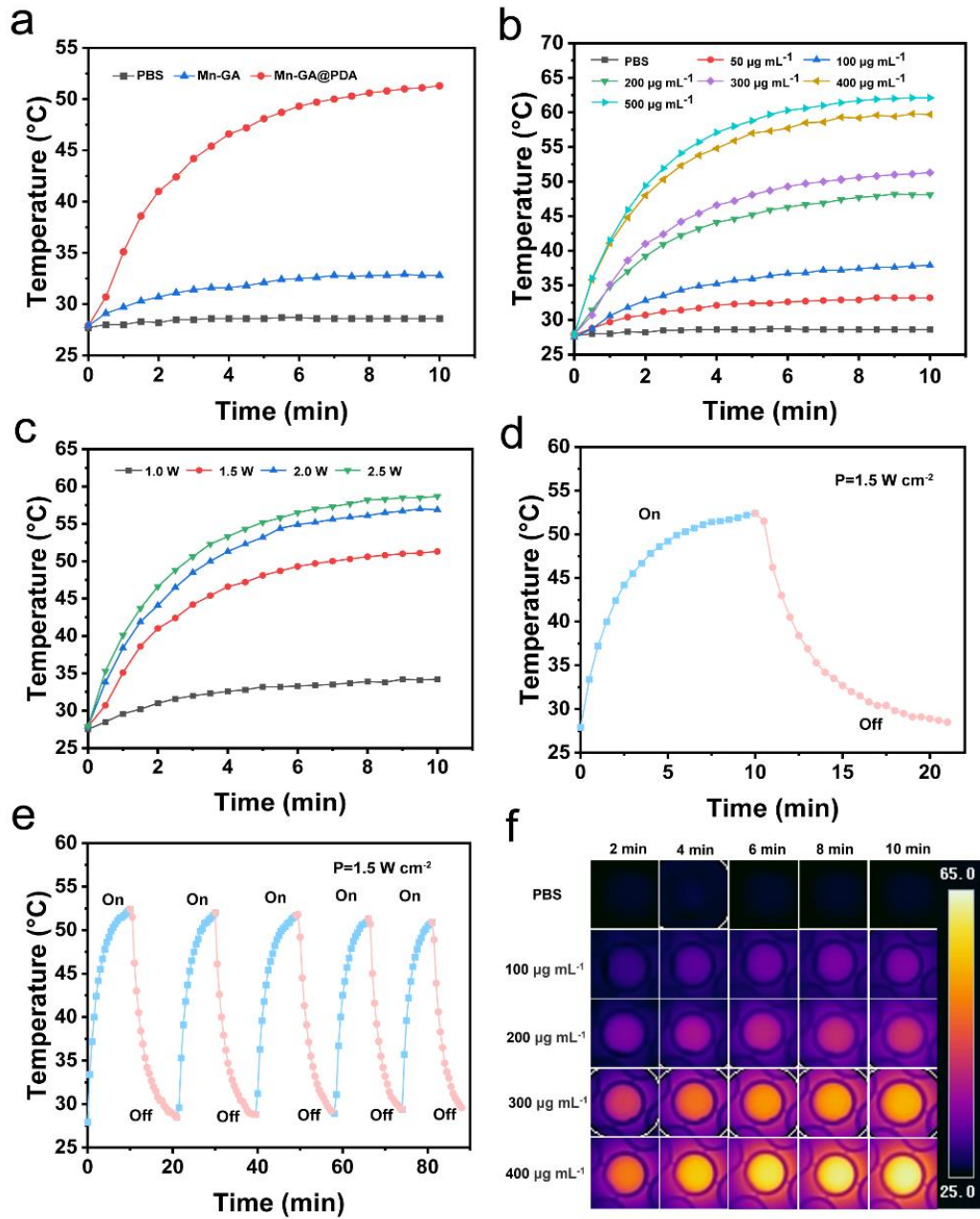


图 2-11. Mn-GA@PDA 纳米颗粒的光热性能表征: (a) 同浓度下 PBS、Mn-GA 和 Mn-GA@PDA 纳米材料在 808 nm 近红外激光 (1.5 W cm^{-2} , 10 min) 照射下的光热升温曲线; (b) Mn-GA@PDA 纳米颗粒在不同浓度梯度 ($0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 \text{ µg mL}^{-1}$), 相同功率 (1.5 W cm^{-2}) 的 808 nm 近红外激光下照射 10 min 的光热升温曲线; (c) Mn-GA@PDA 纳米颗粒在不同功率梯度 ($1.0, 1.5, 2.0, 2.5 \text{ W cm}^{-2}$), 相同浓度 (300 µg mL^{-1}) 的 808 nm 近红外激光下照射 10 min 的光热升温曲线; (d, f) 浓度为 300 µg mL^{-1} 的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒在 808 nm 近红外激光下 (1.5 W cm^{-2}) 照射 10 min, 冷却 10 min 下的光热冷热单循环曲线及五次光热冷热循环曲线; (f) Mn-GA@PDA 纳米颗粒在不同浓度梯度 ($0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 \text{ µg mL}^{-1}$), 相同功率 (1.5 W cm^{-2}) 的 808 nm 近红外激光下照射 10 min

的光热数码照片图

Figure 2-11. Characterization of the photothermal properties of Mn-GA @PDA NPs. (a) The heating curves of PBS, Mn-GA NPs and Mn-GA@PDA NPs were irradiated with 808 nm near-infrared laser (1.5 W cm^{-2} , 10 min); (b) The photothermal heating curves of 808 nm near infrared laser with different concentration gradients of Mn-GA@PDA NPs (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and the same power (1.5 W cm^{-2}) were irradiated for 10 min; (c) The photothermal heating curves of 808 nm near-infrared laser irradiation for 10 min under different power gradients (1.0, 1.5, 2.0, 2.5 W cm^{-2}) at Mn-GA@PDA NPs material concentration (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$); (d, f) Thermal and photothermal single curves and five thermal cycle curves were obtained by 808 nm (1.5 W cm^{-2}) near-infrared laser irradiation for 10 min when the concentration of Mn-GA@PDA NPs was 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (f) The photothermal digital images of Mn-GA@PDA NPs with different concentration gradients (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were irradiated by 808 nm near-infrared laser with the same power (1.5 W cm^{-2}) for 10 min

2.4 本章小结

本章设计并合成了一种多巴胺改性的没食子酸锰基纳米颗粒 (Mn-GA@PDA NPs)。没食子酸邻苯二酚基团具有强大的配位作用与金属锰离子发生配位形成络合物。将制备的络合物在多巴胺的作用下改性，以此来提升纳米颗粒的稳定性及其光热性能。本研究制备合成的纳米颗粒具有较小的粒径和均一度。而且 Mn-GA@PDA 纳米颗粒能够释放出 Mn^{2+} ，通过类芬顿反应催化过氧化氢分解成羟基自由基和氧气，具有类过氧化物酶和类过氧化氢酶的催化活性。Mn-GA@PDA 纳米颗粒由于锰离子的存在，还具有良好的核磁显影效果，可以用做 MRI 造影剂来实现磁共振成像检测。此外，该纳米材料在 808 nm 近红外区域具有一定的光热稳定性，具有一定的光热治疗效果，在开发新型 MRI 引导的光热治疗肿瘤探针上具有很大潜力。

第三章 Mn-GA@PDA 纳米颗粒体外研究

3.1 引言

Mn-GA@PDA 纳米材料进入肿瘤细胞后，在肿瘤微环境这种弱酸性环境中能够使得没食子酸配位键断链，释放 Mn^{2+} ，通过化学动力法催化内源性过氧化氢产生羟基自由基和氧气，诱导肿瘤细胞发生凋亡。Mn-GA@PDA 纳米材料在近红外光的照射下，将光能转化为热能产生一定的热量，进一步加快催化内源性过氧化氢，此外随着温度的提升，能够实现光热消融肿瘤细胞，进一步加大对肿瘤细胞的杀伤。

在本章节中，我们以鼠源型乳腺癌细胞 4T1 细胞系作为模型，主要验证了 Mn-GA@PDA 纳米材料对肿瘤细胞的杀伤能力。

3.2 实验条件与实验方法

3.2.1 实验所需仪器设备

表 3-1. 纳米材料体外细胞学研究所需要的主要设备与仪器

Table 3-1. Main equipment and instruments needed for *in vitro* cytology research of nanomaterials

仪器名称	型号	生产厂家
恒温振荡摇床	ZHTY-50V	知楚仪器有限公司，上海
电子天平	ISO9001	赛多利斯有限公司，北京
pH/mV 计	MP512-03Meter	三信有限公司，上海
超声波处理机	1500F-DZ	新芝生物科技股份有限公司，宁波
水纯化系统	RODI-220AI	锐思捷水纯化技术有限公司，厦门
医用离心机	L500	湘仪实验室仪器开发有限公司，湖南
电冰箱	4、-20、-80 °C	海尔生物医疗股份有限公司，青岛
生物安全柜	HR40-ILA2	海尔生物医疗股份有限公司，青岛
二氧化碳培养箱	3111	Thermo Fisher Scientific，美国
近红外激光器	LR-MFJ-808	镭锐光电科技有限公司，长春
红外热成像仪	Fluke Ti480U	福禄克测试仪器有限公司，上海
紫外分光光度计	UV-3600i Plus	岛津有限公司，香港
多功能酶标仪	MULTISKAN GO	Thermo Fisher Scientific，美国
倒置荧光显微镜	DMi 1	徕卡公司，德国

3.2.2 实验所需试剂耗材

表 3-2. 纳米材料体外细胞学研究所需要的主要试剂与耗材

Table 3-2. Main reagents and consumable needed for *in vitro* cytology research of nanomaterials

试剂与耗材名称	生产厂家
小鼠乳腺癌 4T1 细胞	ATCC, 美国
EP 管	贝晶生物技术有限公司, 上海
细胞冻存液	博奥龙免疫技术有限公司, 北京
细胞计数板	Marientfeld 公司, 德国
细胞培养瓶	洁特生物过滤股份有限公司, 广州
离心管	洁特生物过滤股份有限公司, 广州
细胞冻存管	洁特生物过滤股份有限公司, 广州
细胞培养板	洁特生物过滤股份有限公司, 广州
胎牛血清	广东广试试剂科技有限公司, 肇庆
青链霉素	Gibco 公司, 美国
0.25%胰蛋白酶	Gibco 公司, 美国
75%乙醇	阿拉丁试剂有限公司, 上海
DEME 细胞培养基	Gibco 公司, 美国
MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒	碧云天生物科技有限公司, 上海
Calcein AM/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	碧云天生物科技有限公司, 上海
活性氧检测试剂盒	碧云天生物科技有限公司, 上海
二甲基亚砜	阿拉丁试剂有限公司, 上海

3.2.3 实验方法

1. 细胞培养

从美国模式培养物库 (ATCC) 购得小鼠乳腺癌 4T1, 在含有 10%胎牛血清及 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养液中, 4T1 细胞系于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行培养, 并以 2 天一换的方式进行培养。

2. 细胞溶血实验

细胞溶血活性用文献报道的方式进行测定。首先使用抗凝管收集 SD 大鼠的颈动脉新鲜血液，然后以 1500 rpm 转速离心 15 分钟。将所得沉淀用生理盐水重新悬浮以获得 4 wt% 红细胞悬液。使用 1.5 mL 的 EP 管，将 500 μL 的 4 wt% 红细胞悬液与等体积的 PBS 磷酸盐缓冲液、去离子水，不同浓度梯度的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒 (50, 100, 150, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 相混合，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 4 小时。含有纯化红细胞的 PBS 和去离子水分别作为阴性和阳性对照。将混合物以 2000 rpm 离心 15 分钟除去血细胞，将 100 μL 不含样品上清液小心转移到 96 孔板上进行进一步分析。然后在酶标仪上测定血红蛋白在 540 nm 处的吸光度。通过溶血公式计算溶血率，溶血率的计算公式如下：

$$\text{溶血率 (\%)} = (A_t - A_n) / (A_p - A_n) \times 100\%$$

A_t : 实验孔的吸光度值 A_p : 阳性组的吸光度值 A_n : 阴性组的吸光度值

3. 细胞毒性研究

将 4T1 细胞按 1×10^4 个/孔的细胞密度接种到 96 孔板中，并在环境为湿度 100%，37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 至所有细胞均贴壁生长。去除培养孔板中的培养基并在每孔中分别加入 100 μL 不同浓度的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒 (50, 100, 150, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 培养基混合液，设计不添加任何化合物的纯培养基作为空白对照，每个浓度设置 6 个复孔。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 的培养箱中孵育 24 h，48 h。培养完后，用 PBS 洗涤，去除游离的纳米颗粒，每孔中添加含有 MTT (10 μL ，5 mg mL^{-1}) 的培养基 100 μL ，然后置于培养箱中温育 4 h。随后，将 150 μL 的 DMSO 溶液加入到每个孔中，在恒温摇动的摇床上轻轻摇动 20 分钟。最后，用酶标仪测定各孔在 490 nm 波长下测量光密度值，并对结果进行统计分析和绘制，计算细胞存活率，从而评估 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的细胞毒性，细胞活性的测定公式如下：

$$\text{细胞活性 (\%)} = (A_s - A_b) / (A_c - A_b) \times 100\%$$

A_s : 实验孔的吸光度值 A_c : 对照组的吸光度值 A_b : 空白组的吸光度值

4. 活细胞/死细胞染色

将 4T1 细胞按 1×10^5 个/孔的细胞密度接种到 24 孔板中，并在环境为湿度 100%，37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 至所有细胞均贴壁生长。移去孔板中的培养基，随后分为 Control、Control+NIR、Mn-GA、Mn-GA+NIR、Mn-GA@PDA、Mn-GA@PDA+NIR 六组，使用 1.5 W cm^{-2} ，808 nm 近红外激光照射 10 min 处理细胞，然后再放入培养箱孵育 6 h，弃掉培养基，用 PBS 洗涤一遍，最后使用钙

黄绿素-AM/碘化丙啶-PI 染色试剂对活细胞和死亡细胞进行染色，每个孔中加入 250 μL 0.2 μM 钙绿素-AM 和碘化丙啶-PI 共孵育 45 min。最后，用荧光显微镜观察细胞染色结果。

5. 细胞内活性氧（ROS）检测

通过将细胞内二乙酸酯（DCFH/DA）中的二氯荧光转化为荧光产物 DCF 来测定 ROS 的生成。4T1 细胞按 1×10^5 个/孔的细胞密度接种到 24 孔板中，并在环境为湿度 100%，37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 至所有细胞均贴壁生长。移去孔板中的培养基，设置 Control、Control+ H_2O_2 、Mn-GA、Mn-GA+NIR、Mn-GA@PDA、Mn-GA@PDA+NIR 六个组和细胞共孵育 2 h，其中使用的 1.5 W cm^{-2} ，808 nm 近红外激光照射 10 min。然后，每孔加入 1 μM DCFH/DA，37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育 40 min，然后将细胞用 PBS 洗涤 2 次，用 PBS 重悬，用激光共聚焦扫描显微镜观察不同组细胞中活性氧（ROS）的生成情况。

6. 光热细胞消融实验

将 4T1 细胞按 1×10^4 个/孔的细胞密度接种到 96 孔板中，并在环境为湿度 100%，37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 至所有细胞均贴壁生长。移去孔板中的培养基，重新加入 100 μL 不同浓度的 Mn-GA@PDA 纳米材料（0，25，50，100，200，300 和 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）和 PBS 缓冲液与 4T1 细胞共孵育 4 h，随后分别用不同功率密度为 1.5 W cm^{-2} 的 808 nm 的激光照射 10 min。移去孔板中的培养基，用 PBS 洗涤，去除游离的纳米颗粒。每个孔中添加含有 MTT（10 μL ，5 mg mL^{-1} ）的培养基 100 μL ，然后置于培养箱中温育 4 h。随后，将 150 μL 的 DMSO 溶液加入到每个孔中，在恒温摇动的摇床上轻轻摇动 20 分钟。最后，用酶标仪测定各孔在 490 nm 波长下测量光密度值，并对结果进行统计分析和绘制，计算细胞存活率，从而评估 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的细胞毒性。

3.3 结果与讨论

3.3.1 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的溶血性

通过体外溶血实验进一步研究了的生物相容性。如图 3-1 所示，所有样品都具有良好的血液相容性。即使材料浓度高达 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的情况下材料的血液相容

率只有 6.7%，在低浓度下材料的溶血效果可以忽略不计。根据生物材料的生物相容性测试标准，一般认为溶血率小于 5% 为无溶血风险，实验结果可以说明样品均具有良好的血液相容性，以便于后续的小鼠尾静脉注射药物。

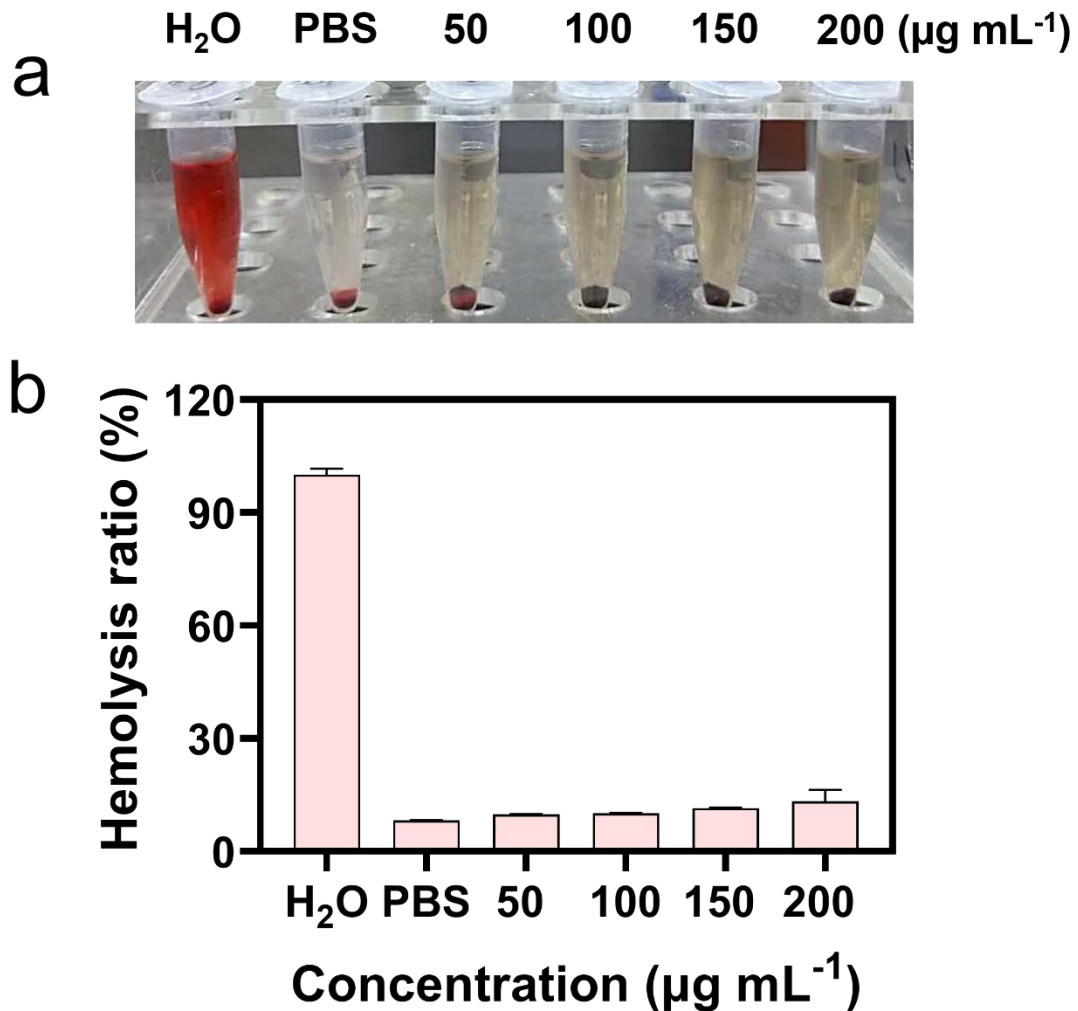


图 3-1. Mn-GA@PDA 纳米颗粒的溶血性能：(a) 材料溶血情况数码照片；(b) Mn-GA@PDA 纳米颗粒在不同浓度梯度（0, 50, 100, 200 μg mL⁻¹）的溶血率

Figure 3-1. Hemolytic properties of Mn-GA@PDA nanoparticles. (a) Digital photograph of material hemolysis; (b) Hemolysis rate of Mn-GA@PDA NPs at different concentration gradients (0, 50, 100, 200 μg mL⁻¹)

3.3.2 Mn-GA@PDA 纳米颗粒的细胞毒性及产生 ROS 的能力

使用 MTT 检测法评估了 Mn-GA@PDA 纳米颗粒对小鼠乳腺癌细胞 4T1 的细胞毒性。如图 3-2 所示，孵育 24 h 和 48 h 的细胞毒都呈线性关系，随着材料浓度

的增加,细胞的毒性逐渐增加。在 Mn-GA@PDA 浓度为 $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时,细胞存活率只达到一半,实验结果表明在浓度大于 $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时, Mn-GA@PDA 材料具有一定的细胞毒性,但是在低浓度下 Mn-GA@PDA 材料具有很好的细胞相容性,对细胞的杀伤作用很小。

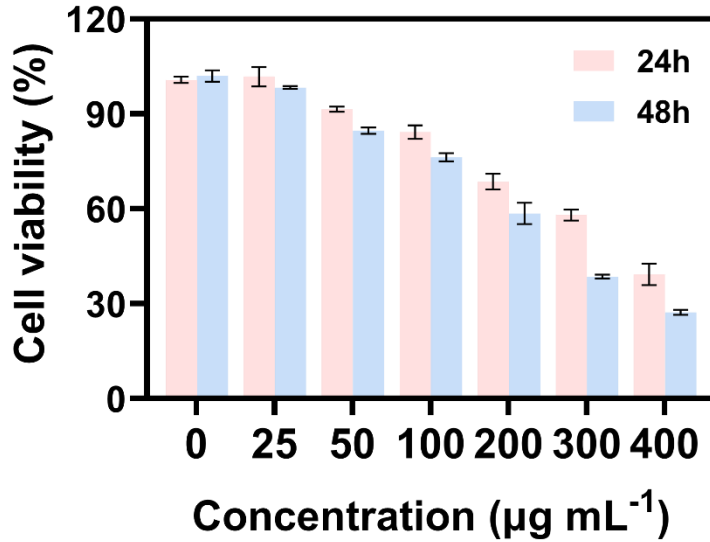


图 3-2. 不同浓度 Mn-GA@PDA 纳米颗粒培养 24 h, 48 h 后的细胞存活率

Figure 3-2. Cell viability with different concentrations of Mn-GA@PDA NPs for 24 and 48 h

据报道活性氧的产生是导致肿瘤细胞毒性的主要原因之一,在第二章节实验中我们展示了 Mn-GA@PDA 具有一定的过氧化物酶活性,能够催化过氧化氢产生 ROS。在细胞层面上,为了验证这观点,采用 ROS 染色技术(DCFH-DA)测定 ROS 生成。DCFH-DA 自身不发光,能自由穿越细胞膜,但在胞内 ROS 作用下,DCFH-DA 会被氧化成具有荧光的 DCF,从而产生绿光。如图 3-3 所示 Mn-GA、Mn-GA+NIR、Mn-GA@PDA、Mn-GA@PDA+NIR 组与阴性对照组(DMEM)相比,都显示大面积的绿色荧光,这说明在材料的催化作用下都能使得 4T1 细胞产生了更多的 ROS。为了进一步证明了材料组能产生 ROS,我们设置了阳性对照(DMEM+H₂O₂)来确保实验的准确性,结果表明阳性对照组能够产生大面积绿色荧光,且荧光强度稍大于各实验组。综上所述, Mn-GA@PDA 纳米颗粒具有产生 ROS 的能力,能够加速催化肿瘤内的过氧化氢,从而实现更好的肿瘤细胞杀伤。

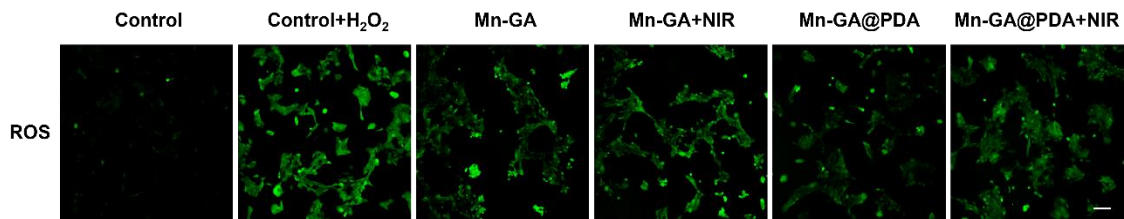


图 3-3. 不同材料处理后 DCFH-DA 染细胞内 ROS 的图片。图中比例尺为 200 μm

Figure 3-3. Pictures of intracellular ROS stained with DCFH-DA after treatment with different materials. The scale bar is 200 μm in the figure

3.3.3 Mn-GA@PDA 纳米颗粒光热消融肿瘤细胞

通过 MTT 检测法和细胞活死染色法进一步在细胞水平上研究了 Mn-GA@PDA 纳米材料的光热消融肿瘤细胞的能力。首次将 4T1 细胞与不同浓度 Mn-GA@PDA 纳米材料 (0, 25, 50, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 的工作液共孵育 4 h。如图 3-4a 所示, 不进行激光照射时, 即使 Mn-GA@PDA 纳米材料浓度高达 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 细胞存活率仍然超过 80%。对共培养 4 h 后的各个孔使用 808 nm 近红外激光照射 (1.5 W cm^{-2} , 10 min), 对照组 (不添加材料组) 的细胞存活率与不使用激光照射几乎没有差别, 但是随着材料浓度的增加, 细胞存活率出现了明显的下降, 当 Mn-GA@PDA 纳米材料浓度为 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率下降至 20%, 比不使用激光照射下降了 60%。实验证明了通过 808 nm 近红外激光的照射能够实现光热消融肿瘤细胞。此外, 进一步探究了同一浓度下, 不同功率对细胞的杀伤效果。如图 3-4b, 实验结果表明随着功率的增加, Mn-GA@PDA 纳米材料对细胞的光热杀伤效果也是呈上升趋势。

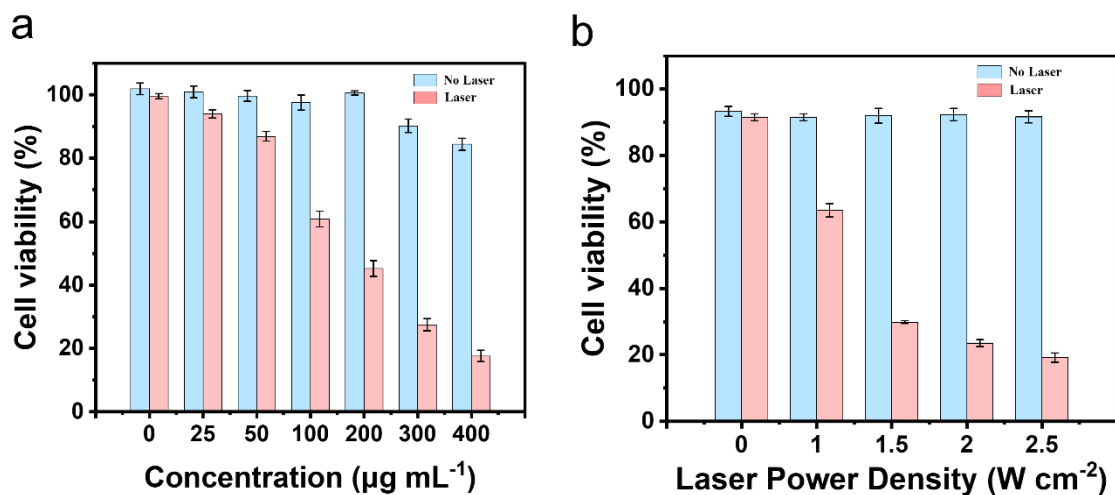


图 3-4. (a) 浓度梯度的 Mn-GA@PDA 纳米材料与 4T1 细胞共培养 4 h 后, 808 nm 近红外激

光 (1.5 W cm^{-2} , 10 min) 照射前后的 4T1 细胞的相对存活率; (b) 同一浓度下 Mn-GA@PDA 纳米材料与 4T1 细胞共培养 4 h 后, 不同功率的 808 nm 近红外激光照射 10 min 前后的细胞相对存活率

Figure 3-4. (a) Relative cell viability before and after irradiation with 808 nm near-infrared laser (1.5 W cm^{-2} , 10 min) after co-culture of Mn-GA@PDA NPs with 4T1 cells for 4 h with a concentration gradient; (b) The relative survival rate of 4T1 cells after co-culture of Mn-GA@PDA NPs with 4T1 cells at the same concentration for 4 h and irradiation with 808 nm near-infrared laser of different power for 10 min

为了更加直观的观察 Mn-GA@PDA 纳米颗粒对肿瘤的光热消融能力, 我们使用钙黄素 AM/PI 双染色法对 Mn-GA@PDA 纳米材料细胞层面上的光热治疗效果进行测定。首先, 先将相同浓度的 DMEM、Mn-GA、Mn-GA@PDA 与 4T1 细胞共孵育 4 h, 然后使用 1.5 W cm^{-2} 的 808 nm 近红外激光照射 10 min, 比较不同样品之间的光热治疗效果。如图 3-5 所示, 所有没有使用 808 nm 近红外激光照射的组都显示出大面积的绿色荧光, 而使用 808 nm 近红外激光照射的组只有 Mn-GA@PDA 纳米材料这组显示大部分红色荧光, 4T1 细胞出现了大面积的死亡。而没有多巴胺改性的组中, 即使是使用近红外激光照射也没有导致细胞大面积死亡, 且与对照组差别不大。这说明了 Mn-GA 组不能达到让细胞死亡的温度。综合 MTT 和钙黄素 AM/PI 染色的结果, 证明了多巴胺负载后的 Mn-GA@PDA 纳米材料具有很好的光热能力, 能够有效的实现肿瘤光热消融。

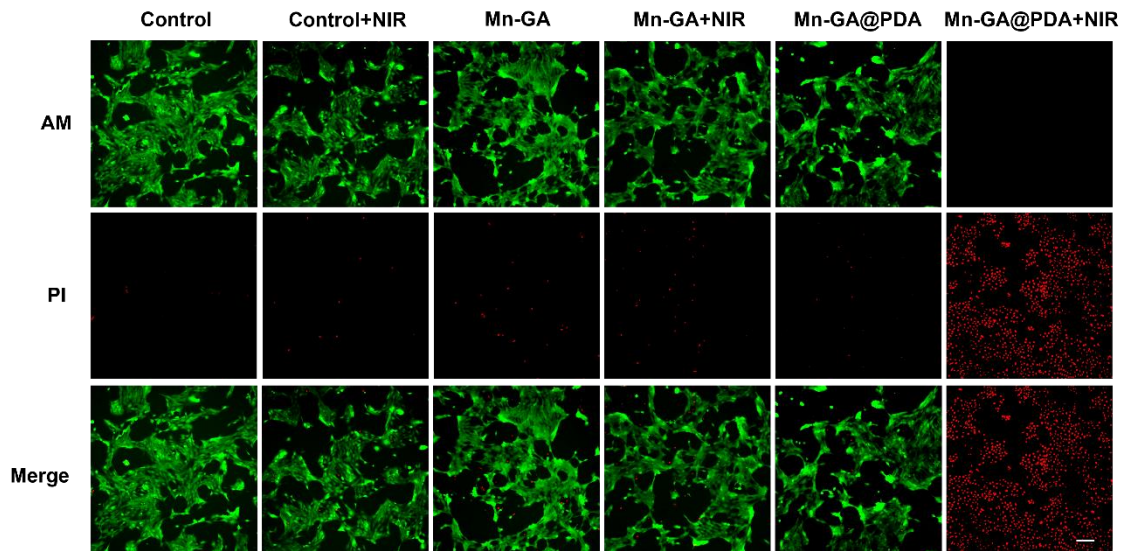


图 3-5. 808 nm 激光以 1.5 W cm^{-2} 的功率照射 10 min 后 AM/PI 图片。图中比例尺为 $200 \mu\text{m}$

Figure 3-5. Pictures of live and dead staining of cells irradiated with 808 nm laser at a power of 1.5

W cm⁻² for 10 min. The scale bar is 200 μ m in the Figure

3.4 本章小结

本章在细胞层面上探究了 Mn-GA@PDA 纳米材料的溶血性、对肿瘤细胞的细胞毒性、催化产生 ROS 的能力以及光热消杀肿瘤细胞的能力。溶血实验和细胞毒性实验表明在低浓度条件下 Mn-GA@PDA 纳米材料具有很好的生物相容性和较低的细胞毒性，细胞毒性与材料浓度呈正比。此外，Mn-GA@PDA 纳米材料具有一定的过氧化物酶活性，能够催化肿瘤内的过氧化氢生产 ROS，对肿瘤细胞进行杀伤。光热消融实验证明 Mn-GA@PDA 纳米材料在近红外激光的照射下可以杀死绝大部分的肿瘤。综上所述，Mn-GA@PDA 纳米材料具有一定的光热效果能对肿瘤细胞进行有效抑制。

第四章 Mn-GA@PDA 纳米颗粒体内研究

4.1 引言

癌症是一种严重危害人类生命的重大疾病，其致死率极高。如何实现癌症的早期诊断与治疗，已成为医学界的一个重要课题。磁共振成像技术因其灵敏度高、非入侵、安全快速等优点，成为了临床检测的主要诊断手段。其中具有高对比度的 MRI 造影剂是实现肿瘤早期诊断的关键。研究发现，金属有机配合物纳米颗粒具有生产成本低、分子结构可调控等优点，广泛应用于光热成像、磁共振成像及其药物载体等多种领域。

我们设计了一种金属有机配合物 Mn-GA@PDA 纳米颗粒作为纳米诊疗具有磁共振成像能和一定的光热治疗效果。在本章节中我们设计以 4T1 皮下荷瘤小鼠为动物模型，进行体内的 MRI、肿瘤杀伤和体内安全性评价实验，讨论了 Mn-GA@PDA 纳米颗粒在体内检测肿瘤和治疗肿瘤的有效性和安全性。

4.2 实验条件与实验方法

4.2.1 实验所需仪器设备

表 4-1. 纳米材料体内诊断和治疗肿瘤研究所需要的主要设备与仪器

Table 4-1. Main equipment and instruments needed for *in vivo* diagnosis and treatment of tumors with nanomaterials

仪器名称	型号	生产厂家
电子天平	ISO9001	赛多利斯有限公司，北京
ICP-MS	Icap6300	Thermo Fisher Scientific，美国
水纯化系统	RODI-220AI	锐思捷水纯化技术有限公司，厦门
医用离心机	L500	湘仪实验室仪器开发有限公司，湖南
组织脱水机	JJ-121	俊杰电子有限公司，武汉
组织包埋机	JB-L5	俊杰电子有限公司，武汉
组织切片机	CM 1520	徕卡公司，德国
近红外激光器	LR-MFJ-808	镭锐光电科技有限公司，长春
红外热成像仪	Fluke Ti480U	福禄克测试仪器有限公司，上海
磁共振成像仪	Bruker Biospect3.0	Bruker Biospect，德国
倒置荧光显微镜	DMi 1	徕卡公司，德国

4.2.2 实验所需试剂耗材

表 4-2. 纳米材料体内诊断和治疗肿瘤研究所需要的主要试剂与耗材

Table 4-2. Main reagents and consumable needed for *in vivo* diagnosis and treatment of tumors with nanomaterials

试剂与耗材名称	生产厂家
小鼠乳腺癌 4T1 细胞	ATCC, 美国
EP 管	贝晶生物技术有限公司, 上海
PBS 缓冲液	塞维尔生物科技有限公司, 武汉
75%乙醇	阿拉丁试剂有限公司, 上海
石蜡	塞维尔生物科技有限公司, 武汉
苏木精/伊红(HE)染色套盒	塞维尔生物科技有限公司, 武汉
4%多聚甲醛固定液	塞维尔生物科技有限公司, 武汉

4.2.3 实验方法

1. 动物肿瘤模型的构建

采用雌性 Balb/c 小鼠(4~6 周)构建皮下乳腺癌模型, 研究 Mn-GA@PDA 纳米材料加光照和不加光照的体内抗肿瘤活性及其材料的在动物体内的成像能力。所有涉及动物的程序均有上海市第十人民医院机构动物护理和使用委员会审查和批准(编号: SHDSYY-2023-3315)。具体做法为: 用胰蛋白酶将处于对数生长期的 4T1 细胞消化下来, 离心后用 PBS 重悬置在 EP 管中冰浴备用。将 100 μL 含有 1×10^7 的 4T1 细胞 PBS 悬浊液注射到雌性小鼠后肢皮下, 构建皮下动物模型, 待肿瘤生长至 60 mm^3 , 进行后续磁共振成像和光热肿瘤治疗实验。

2. 动物肿瘤成像实验

使用异氟烷溶液作为麻醉剂, 用气麻机使小鼠完全麻醉后, 按锰元素/老鼠重量 = 4 mg kg^{-1} 为单位, 将 Mn-GA@PDA 纳米材料经小鼠尾静脉注射, 然后使用小动物磁共振成像仪对小鼠肿瘤区域进行磁共振成像, 分别记录注射前和注射后不同时间点的核磁信号。

3. 体内光热治疗

采用皮下注射方式, 20 只平均瘤块 60 mm^3 左右的荷瘤鼠分成 4 组 ($n=5$)。分组实验分别为: ①各小鼠瘤内注射 100 μL PBS 缓冲液、②各小鼠瘤内注射 100

μL , 5 mg kg^{-1} 的 Mn-GA 纳米颗粒并进行近红外激光 (1.5 W cm^{-2} , 10 min) 照射小鼠肿瘤、③各小鼠瘤内注射 $100\text{ }\mu\text{L}$, 5 mg kg^{-1} 的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒、④小鼠瘤内注射 $100\text{ }\mu\text{L}$, 5 mg kg^{-1} 的 Mn-GA@PDA 纳米颗粒并进行近红外激光 (1.5 W cm^{-2} , 10 min) 照射小鼠肿瘤。对进行近红外激光照射的实验组使用红外热像仪记录温度变化曲线。在第 0, 3, 6, 9 天对肿瘤进行治疗, 每隔两天测量小鼠体重和肿瘤尺寸的变化, 并根据小鼠肿瘤的长宽计算肿瘤体积。

$$\text{瘤体体积} = \text{瘤体长径} \times (\text{瘤体长径})^2 / 2$$

4. 组织病理学和免疫组织化学切片

处理 14 天后, 将每组小鼠处死, 取出肿瘤组织和主要器官, 固定于 4% 多聚甲醛中。对所有组织用石蜡包埋, 切片, 装在玻片上, 使用 HE 染色对组织进行组织病理学分析。此外采用 Ki-67 法检测肿瘤组织中乳腺癌的增殖情况。

4.3 结果与讨论

4.3.1 Mn-GA@PDA 纳米颗粒体内磁共振成像

Mn^{2+} 离子溶液具有一定等磁共振显影能力。因此, 我们对 Mn-GA@PDA 纳米材料进行了小鼠皮下乳腺癌模型中的弛豫性能测试, 探究了 Mn-GA@PDA 纳米材料在体内肿瘤中的 MRI 成像效果。纳米材料按锰元素含量比小鼠体重 $= 4\text{ mg kg}^{-1}$ 给小鼠进行静脉注射。如图 4-1 所示为 Balb/c 皮下荷瘤小鼠尾静脉注射 Mn-GA@PDA 纳米材料在小动物磁共振成像仪上注射前后不同时间点的 T1 加权 MRI 图像。结果显示, 相比于注射 Mn-GA@PDA 纳米材料前, 0.5 h 时候可以明显观察到肿瘤的边缘, 造影剂开始慢慢的填充肿瘤, 并且在 1 h 时信号增强, 在肿瘤区域的亮度明显增强, 这也可以表明 Mn-GA@PDA 溶液能在短时间内有效的富集在肿瘤区域, 能够起到良好的诊断作用。在 1.5 h 时候在肿瘤区域的亮度明显相对于 1 h 时候明显降低, 开始逐渐到初始状态。因此, Mn-GA@PDA 纳米材料能够作为 MRI 造影剂进行 MRI 诊断。

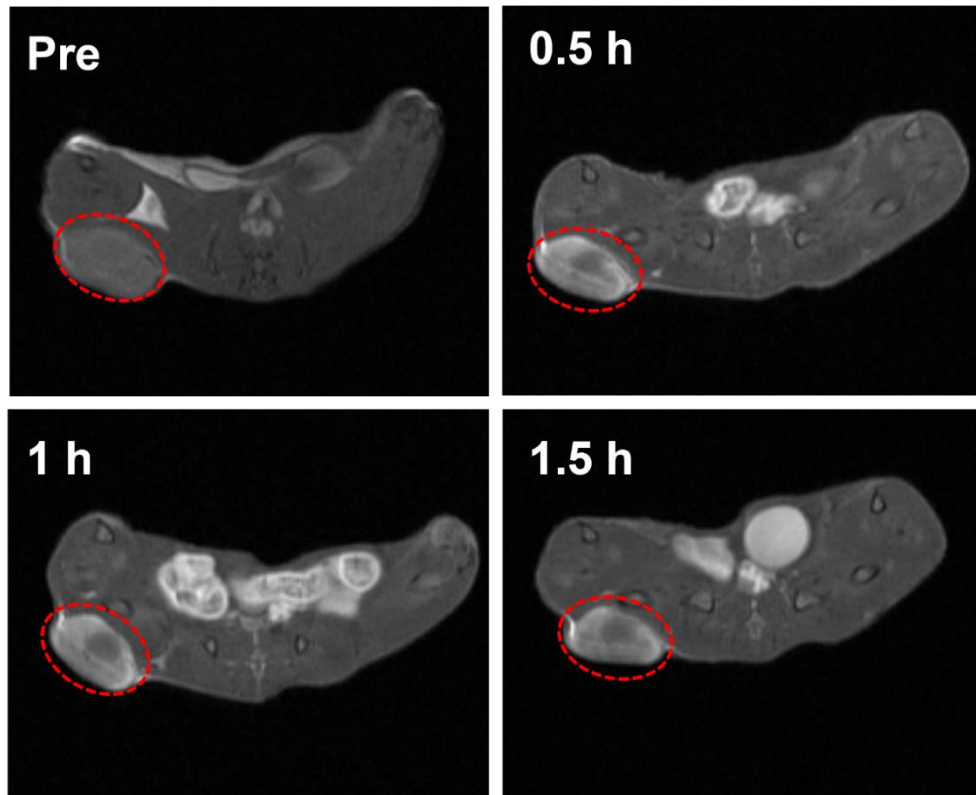


图 4-1. 尾静脉注射 Mn-GA@PDA 纳米材料造影剂前后不同时间点获得皮下肿瘤小鼠的 T1 加权 MR 图像

Figure 4-1. T1-weighted MR Images of mice with subcutaneous tumors were obtained at different time points before and after tail vein injection of Mn-GA@PDA nanomaterial contrast agent

4.3.2 Mn-GA@PDA 纳米颗粒体内光热治疗肿瘤

在本节中，我们研究了 Mn-GA@PDA 纳米颗粒材料在近红外光照射下抗肿瘤的治疗，我们使用 4T1 皮下荷瘤 Balb/c 小鼠作为皮下肿瘤模型(图 4-2)。

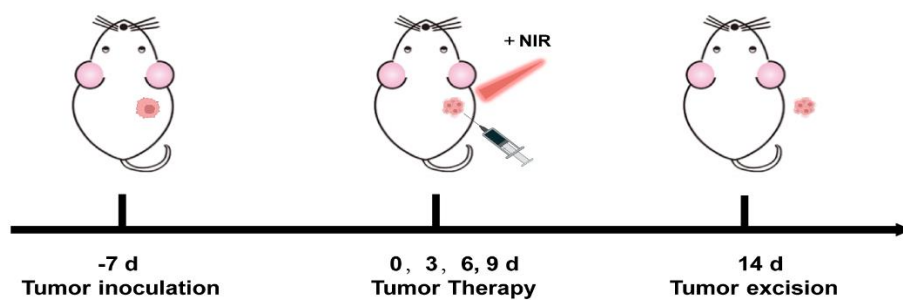


图 4-2. 抗肿瘤治疗的体内评价方案

Figure 4-2. *In vivo* evaluation protocol for antineoplastic therapy

对照组小鼠在肿瘤给药时注射 PBS 磷酸盐缓冲液体。实验小鼠在 0 day、3 day、6 day、9 day（每隔 3 天）给与肿瘤瘤内注射 $100\ \mu\text{L}$ ， $5\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ 的 Mn-GA 纳米颗粒和 Mn-GA@PDA 纳米颗粒，并使用 $1.5\ \text{W}\ \text{cm}^{-2}$ 的近红外激光照射 10 min。每两天对肿瘤体积及其小鼠体重进行测量并记录（图 4-3c 和 d）。图 4-3a 为不同实验组小鼠处死后取下来的肿瘤图片，图 4-3b 为对应的具体数值比对。实验结果表明 14 天内各组小鼠的体重均稳定增加，这表明 Mn-GA@PDA 纳米材料具有很好的生物安全性。结果显示不使用近红外激光照射的 Mn-GA@PDA 纳米材料的抗肿瘤效果与使用近红外激光照射的 Mn-GA 纳米材料的抗肿瘤材料相似，都具有一定的抗肿瘤效果，但是远不如使用近红外激光照射的 Mn-GA@PDA 纳米材料，这说明了聚多巴胺改性赋予纳米材料更好的光热性能，能够更好的发挥光热效应，对肿瘤有更强的杀伤效果。根据分析对比 Mn-GA@PDA 纳米材料+NIR 组和 PBS 组具有显著性差异，抗肿瘤效果是 PBS 组的 9.5 倍，是 Mn-GA+NIR 组和不使用激光照射的 5.7 倍。通过近红外光照射后的 Mn-GA@PDA 纳米材料具有优异的光热治疗肿瘤效果，达到了有效抑瘤的效果。

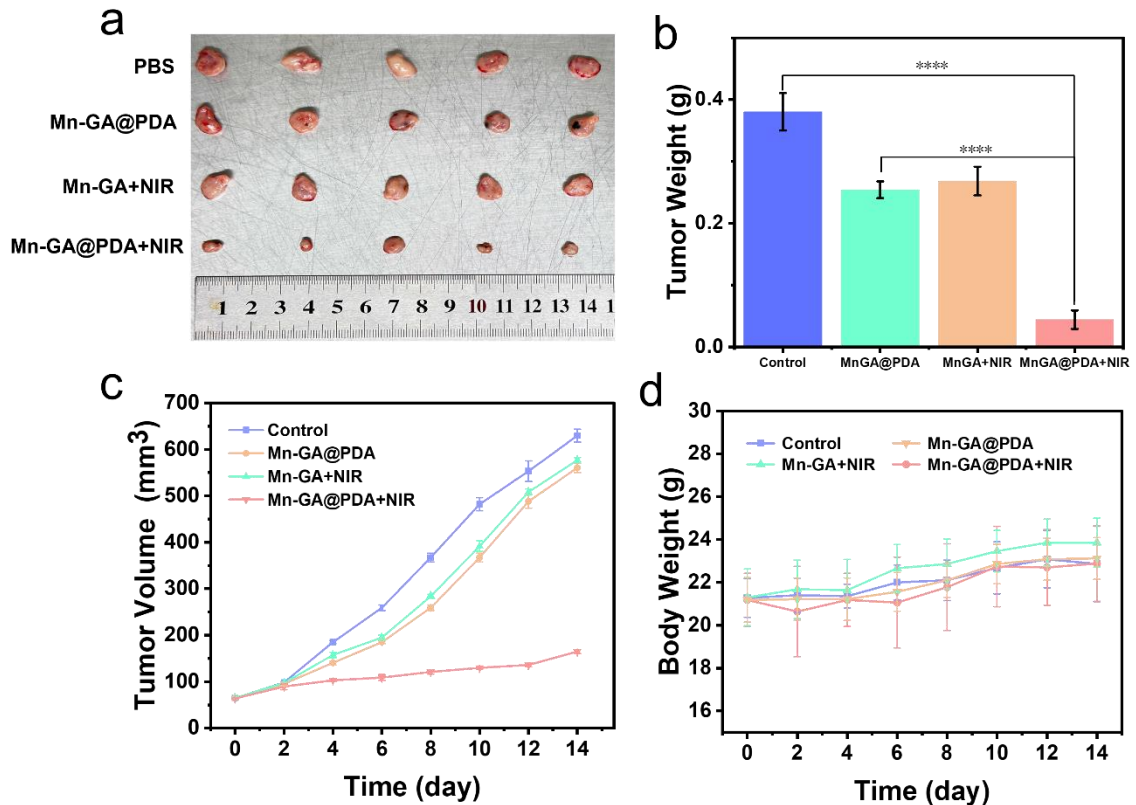


图 4-3. 纳米材料抗肿瘤治疗：（a）肿瘤治疗效果照片；（b）治疗结束后肿瘤组织的平均重量；（c）治疗 14 天肿瘤大小的相对体积曲线；（d）荷瘤小鼠治疗 14 天内体重变化曲线

Figure 4-3. Anti-tumor therapy with nanomaterials. (a) Photographs of the effects of tumor

treatment; (b) the mean weight of tumors collected at the end of treatment; (c) Relative volume curves of tumor size after 14 days of therapy; (d) 14-day body weight curve of tumor-bearing mice

此外，对小鼠的主要脏器（心脏、肝脏、肺、肾脏、脾脏）标本进行切片，进行苏木精和伊红染色（H&E）染色，以评估纳米材料的毒性。H&E 染色（图 4-4）结果显示各实验小组的主要脏器均无明显细胞损坏和严重反应，进一步证明了 Mn-GA@PDA 纳米颗粒在体内无明显的毒性，生物安全性良好。

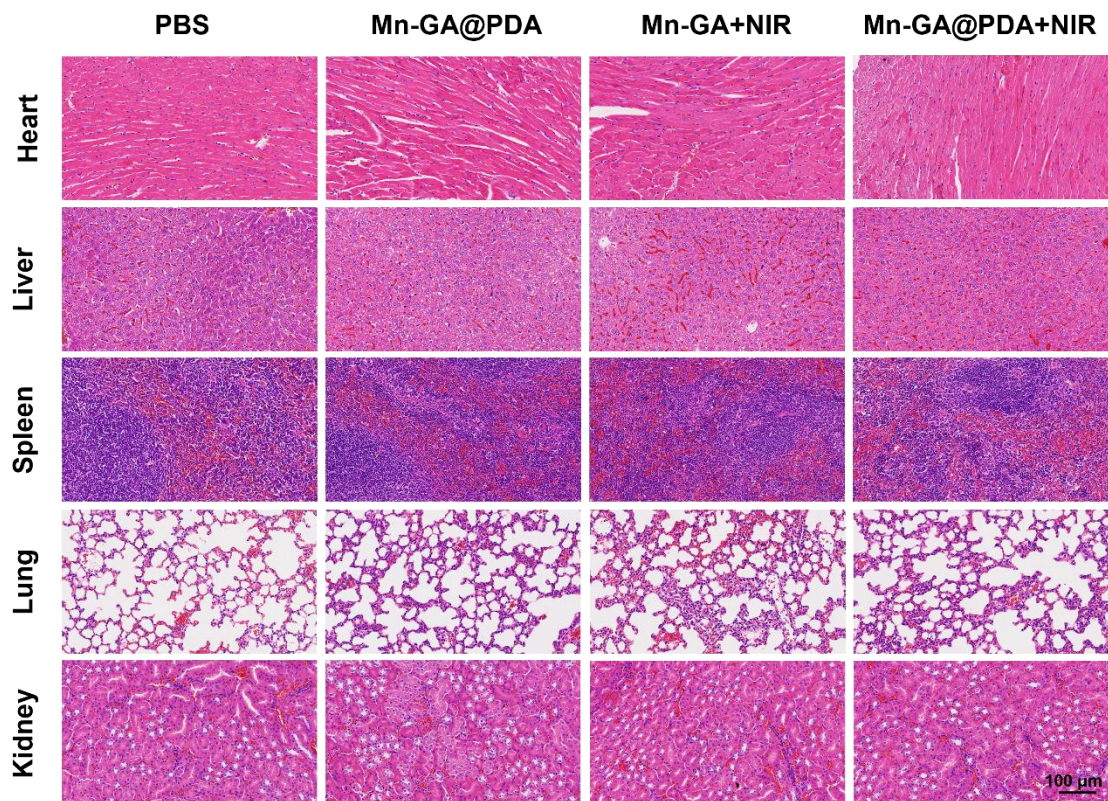


图 4-4. 各实验组小鼠的主要器官（心脏、肝脏、肺、肾脏、脾脏）的 H&E 染色图片。嵌入比例尺为 100 μm

Figure 4-4. H&E staining images of major organs (heart, liver, lung, kidney, spleen) of mice in each experimental group. The scale bar is 100 μm

对肿瘤标本进行 H&E 染色和 Ki67 染色。如图所示，PBS 组 4T1 肿瘤细胞增殖良好，细胞核较大，呈椭圆形。相比之下，实验组 4T1 肿瘤细胞的细胞密度显著减低，细胞间隙增大，细胞缩小，特别是激光照射组，抑制细胞增值效果更加明显。Ki67 是一种细胞增殖标志物，通过分析肿瘤样本中 Ki67 的表达可以显示肿瘤细胞的生长状况。Ki67 阳性率越高，说明肿瘤的生长速度越快。在 Mn-GA@PDA 纳米颗粒+NIR 组中，细胞增殖减少，Ki67 表达明显降低。因此，

病理分析结果表明 Mn-GA@PDA 纳米颗粒可以通过光热效应对肿瘤细胞产生影响，对肿瘤进行光热消融，从而达到一定的抑瘤效果（图 4-5）。

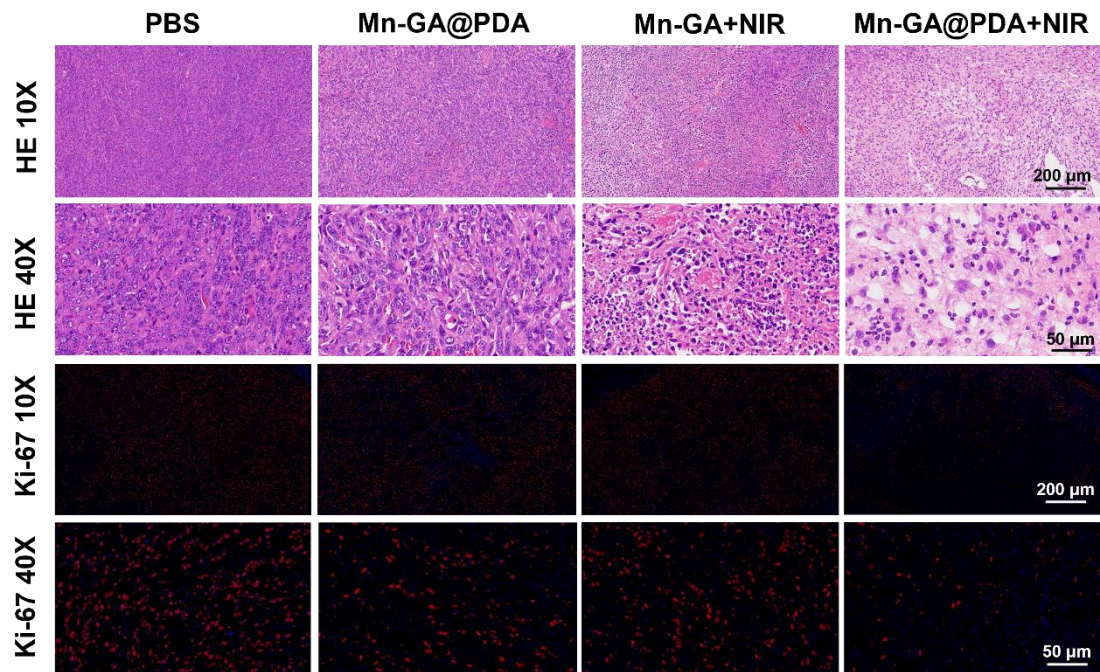


图 4-5. 各实验组小鼠肿瘤组织的 H&E 染色图片和 Ki67 免疫组化图片（10× and 40×）。

嵌入比例尺为 200 μm (10×) and 50 μm (40×)

Figure 4-5. H&E staining images and Ki67 immunohistochemical images of tumor tissues of mice in each experimental group (10× and 40×). The scale bar is 200 μm (10×) and 50 μm (40×)

4.4 本章小结

本章节中，通过对 Mn-GA@PDA 纳米诊疗剂的磁共振成像能力和对肿瘤的光热杀伤作用进行研究。Mn-GA@PDA 纳米诊疗剂在近红外光的作用下，具有一定的光热性能，可以作为一种优秀的光热抗肿瘤治疗剂，抑制肿瘤的增殖。同时 Mn-GA@PDA 纳米诊疗剂在体内也具有一定的磁共振成像能力，这对临床上诊疗一体化探针的研究和发展具有重要意义。

总结与展望

综上所述，本研究表明我们制备了一种多酚有机物和金属锰离子配位的无定形的纳米材料——多巴胺改性的没食子酸锰纳米颗粒（Mn-GA@PDA NPs）。这种纳米颗粒能够同时实现磁共振成像（MRI）和光热/化学动力疗法，帮助我们更精确地定位和治疗肿瘤。通过深入研究这些纳米颗粒的物理化学特性以及它们在生物学上的作用，我们发现该材料具有很好的过氧化物酶活性、光热效果、MRI 成像能力以及抗肿瘤效果。这不仅为临床肿瘤治疗提供了新的可能性，而且具有重要的研究意义和科学价值。简单来说，Mn-GA@PDA NPs 纳米诊疗剂，不仅为肿瘤的诊断和治疗开辟了新的道路，还为癌症诊疗领域的未来发展打下了坚实的基础。

本课题的研究中，还存在一些不足，需要进一步对其进行更深入的研究。第一，未能明确没食子酸与锰离子是如何进行配位的，对其配合物尚未深入探讨其结构和性质，需要对纳米颗粒进行分子动力学模拟分析，这是未来工作的一个重要方向。第二，未对纳米颗粒的抗肿瘤作用机制进行探索，特别是对于不同信号通路的分子机制，还没有进行分子层面上的深入的探究。第三，纳米颗粒对正常组织的长期影响、潜在的脱靶效应以及优化纳米颗粒的剂量和给药方案从而提高治疗效果，减少副作用也是我们需要认真考虑的问题。

目前，本课题研究主要基于体外实验和当单一的动物模型，虽然取得了一些积极的成果，但这些模型可能无法完全模拟人类肿瘤的复杂性，还有许多问题需要进一步探索，争取为癌症的诊断和治疗做出更大的贡献。

参考文献

- [1] Brank F, Laversann M, Weiderpas E, et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 2021, 127(16): 3029-3030.
- [2] Siegel R L, Millek K D, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J. Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [3] Siegel R L, Wagle N S, Cercek A, et al. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(3): 233-54.
- [4] 吴孟超, 陈汉, 沈锋. 原发性肝癌的外科治疗——附 5524 例报告[J]. *中华外科杂志*, 2001, 39(1):4.
- [5] Polette M, Naweocki-raby B, Gilles C, et al. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 2003, 63(10): 2658-2664.
- [6] Spencer K, Parrish R, Barton R, et al. Palliative radiotherapy. *BMJ*, 2018, 360: k821.
- [7] Kim J K, Marco M R , Roxburgh C S D , et al. Survival After Induction Chemotherapy and Chemoradiation Versus Chemoradiation and Adjuvant Chemotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *The oncologist*, 2022, 27(5): 380-388.
- [8] Whitfield C. Chemotherapy gets tuned in. *Nature Reviews Chemistry*, 2021, 5(8): 515-515.
- [9] Blake M. I.4 Advances in Radiotherapy and Radiotherapy Innovations. *Journal of Thoracic Oncology*, 2019, 14(11): S1157.
- [10] De Ruyscher D, Niederman G, Burnet N G, et al. Radiotherapy toxicit. *Nature Reviews Disease Primers*, 2019, 5(1): 13.
- [11] Zhi D, Yang T, O'hang J, et al. Photothermal therapy. *Journal of Controlled Release*, 2020, 325: 52-71.
- [12] Yang Y, Liu Z. Chemiluminescent Nanosystems for Imaging Cancer Chemodynamic Therapy. *Chem*, 2020, 6(9): 2127-2129.
- [13] Ren X, Han Y, Xu Y, et al. Diversified strategies based on nanoscale metal-organic frameworks for cancer therapy: The leap from monofunctional to

- versatile. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 431: 213676.
- [14] Yang J, Dai D, Zhang X, et al. Multifunctional metal-organic framework (MOF)-based nanoplatfoms for cancer therapy: from single to combination therapy. *Theranostics*, 2023, 13(1): 295-323.
- [15] Mehta S, Surese A, Nayak Y, et al. Hybrid nanostructures: Versatile systems for biomedical applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 460: 214482.
- [16] Kose K. Physical and technical aspects of human magnetic resonance imaging: present status and 50 years historical review. *Advances in Physics: X*, 2021, 6(1): 1885310.
- [17] 代婷, 欧阳祖彬. 乳腺癌影像学检查技术的临床应用新进展综述[J]. *科技与健康*, 2023, 2(1): 20-23.
- [18] 洪庆山. X 线、CT 和乳腺磁共振在乳腺癌诊断和保乳术前评估的序贯应用研究[D]. 南方医科大学, 2014.
- [19] 张林医, 崔现成. 磁共振功能成像技术在临床医学中的应用综述[J]. *医疗装备*, 2013, 26(4): 7-9.
- [20] Foltz W D, Jaffray D A. Principles of Magnetic Resonance Imaging. *Radiation Research*, 2012, 11(2): 124-128.
- [21] 岳赛赛. 基于多酚-金属离子络合物肿瘤纳米诊断药物的构建和应用[D]. 北京化工大学, 2022.
- [22] 何庚翰. 基于 Mn^{2+} 掺杂普鲁士蓝的磁共振成像和肿瘤治疗的研究[D]. 南方医科大学, 2021.
- [23] Xiao Y D, Paudel R, Liu J, et al. MRI contrast agents: Classification and application (Review). *International journal of molecular medicine*, 2016, (5): 38.
- [24] Lu Z R, Laney V, Li Y. Targeted Contrast Agents for Magnetic Resonance Molecular Imaging of Cancer. *Accounts of Chemical Research*, 2022, 55(19): 2833-2847.
- [25] Wahsner J, Gale E M, Rodríguez-Rodríguez, Aurora, et al. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chemical Reviews*, 2019, 119(2): 957-1057.
- [26] Boehm I B. Classification of gadolinium-based contrast agents(GBCAs)-adverse reactions. *Magnetic Resonance Imaging*, 2022, 85:

- 1-2.
- [27] Botta C T L. Mn(II) compounds as an alternative to Gd-based MRI probes. *Future Medicinal Chemistry*, 2019, 11(12): 1461-1483.
- [28] Ning Y, Zhou I Y, Rotile N J, et al. Dual Hydrazine-Equipped Turn-On Manganese-Based Probes for Magnetic Resonance Imaging of Liver Fibrogenesis. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(36): 16553-16558.
- [29] Gale E M, Atanasoba I P, Blasi F, et al. A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(49): 15548-15557.
- [30] Runge V M, Heberhage J T. A New Era in Magnetic Resonance Contrast Media. *Investigative radiology*, 2024, 59(2): 105-107.
- [31] Lv J, Roy S, Xie M, et al. Contrast Agents of Magnetic Resonance Imaging and Future Perspective. *Nanomaterials*, 2023, 13(13): 2003.
- [32] Du R, Zhao Z, Cui J, et al. Manganese-Based Nanotheranostics for Magnetic Resonance Imaging-Mediated Precise Cancer Management. *International Journal of Nanomedicine*, 2023, 18: 6077-6099.
- [33] Jiang Z, Yuan B, Qiu N, et al. Manganese-Zeolitic Imidazolate Frameworks-90 with High Blood Circulation Stability for MRI-Guided Tumor Therapy. *Nano-Micro Letters*, 2019, 11(1): 17.
- [34] Carniato F , Ricci M , Tei L, et al. Novel Nanogels Loaded with Mn(II) Chelates as Effective and Biologically Stable MRI Probes. *Small*, 2023, 19(42): 2302868.
- [35] Na H , Lee J , An K , et al. Development of a T1 Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging Using MnO Nanoparticles. *Angewandte Chemie*, 2007, 119(28): 5493-5497.
- [36] Shin J, Anisur R M, Ko M K, et al. Hollow Manganese Oxide Nanoparticles as Multifunctional Agents for Magnetic Resonance Imaging and Drug Delivery. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48(2): 321-324.
- [37] Zhan Y, Zhan W, Li H, et al. In Vivo Dual-Modality Fluorescence and Magnetic Resonance Imaging-Guided Lymph Node Mapping with Good Biocompatibility Manganese Oxide Nanoparticles. *Molecules*, 2017, 22(12):

2208.

- [38] Wang P, Xu X, Wang Y, et al. Zwitterionic Polydopamine-Coated Manganese Oxide Nanoparticles with Ultrahigh Longitudinal Relaxivity for Tumor-Targeted MR Imaging. *Langmuir*, 2019, 35(12): 4336-4441.
- [39] Wei J, Li K, Yu H, et al. Controlled Synthesis of Manganese Oxide Nanoparticles Encaged in Hollow Mesoporous Silica Nanoreactors and Their Enhanced Dye Degradation Activity. *ACS Omega*, 2020, 5(12): 6852-6861.
- [40] Li B, Gu Z, Kurniawan N, et al. Manganese-Based Layered Double Hydroxide Nanoparticles as a T1-MRI Contrast Agent with Ultrasensitive pH Response and High Relaxivity. *Adv Mater*, 2017, 29, 1700373.
- [41] Chevallir P, Walter A, Garofal A, et al. Tailored biological retention and efficient clearance of pegylated ultra-small MnO nanoparticles as positive MRI contrast agents for molecular imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(13): 1779-1790.
- [42] Peng Y K, Lai C W, Liu C L, et al. A new and facile method to prepare uniform hollow MnO/functionalized mSiO core/shell nanocomposites. *Acs Nano*, 2011, 5(5): 4177-4187.
- [43] Hu X, Ji Y, Wang M, et al. Water-soluble and biocompatible MnO@PVP nanoparticles for MR imaging in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2013, 9(6): 976-984.
- [44] Paul G, Prado Y, Dia N, et al. Mn II -containing coordination nanoparticles as highly efficient T1 contrast agents for magnetic resonance imaging. *ChemCom*. 2014, 51: 6740-6743.
- [45] Panich A M, Salti M, Aleksenskii A E, et al. Suspensions of manganese-grafted nanodiamonds: Preparation, NMR, and MRI study. *Diamond and Related Materials*, 2023, 131: 109591.
- [46] Panich A M, Shames A I, Aleksenskii A E, et al. Manganese-grafted detonation nanodiamond, a novel potential MRI contrast agent. *Diamond and Related Materials*, 2021, 119: 108590.
- [47] Sun S, Guan Q, Liu Y, et al. Highly luminescence manganese doped carbon dots. *Chinese Chemical Letters*, 2019, 30(5): 1051-1054.
- [48] Stepanidenko E A, Vedernikova A A, Badriev Z F, et al.

- Manganese-Doped Carbon Dots as a Promising Nanoprobe for Luminescent and Magnetic Resonance Imaging. *Photonics*, 2023, 10(7): 757.
- [49] Ji Z, Ai P, Shao C, et al. Manganese-Doped Carbon Dots for Magnetic Resonance/Optical Dual-Modal Imaging of Tiny Brain Glioma. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2018, 4(6): 2089-2094.
- [50] Tao Q, He G, Ye S, et al. Mn doped Prussian blue nanoparticles for T1. *Journal of nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 18.
- [51] Hou X, Yang X, Xu Y, et al. Manganese-doped mesoporous polydopamine nanoagent for T1–T2 magnetic resonance imaging and tumor therapy. *Nano Research*, 2022, 16(2): 2991-3003.
- [52] Mi P, Koluryo D, Cabral H, et al. A pH-activatable nanoparticle with signal-amplification capabilities for non-invasive imaging of tumour malignancy. *Nat Nanotechnol*, 2016, 11(8): 724-730.
- [53] Thunus L, Lejeune R. Overview of transition metal and lanthanide complexes as diagnostic tools. *Coordination Chemistry Reviews*, 1999, 184(1): 125-155.
- [54] Aschner J L, Aschner M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005, 26(4): 353-362.
- [55] Zheng R, Guo J, Cai X, et al. Manganese complexes and manganese-based metal-organic frameworks as contrast agents in MRI and chemotherapeutics agents: Applications and prospects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2022, 213: 112432.
- [56] Chen M, Liang X, Dai Z. Manganese(III)-chelated porphyrin microbubbles for enhanced ultrasound/MR bimodal tumor imaging through ultrasound-mediated micro-to-nano conversion. *Nanoscale*, 2019, 11(21): 10178-10182.
- [57] Zhang D, Lan W, Zhou Z, et al. Manganese(III) Porphyrin-Based Magnetic Materials. *Topics in Current Chemistry*, 2019, 377(3): 18.
- [58] Cheng Y, Huang W, Wang C, et al. Direct Growth of Poly-Glutamic Acid Film on Peroxidase Mimicking PCN-222(Mn) for Constructing a Novel Sensitive Nonenzymatic Electrochemical Hydrogen Peroxide Biosensor. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(35): 13226-13235.
- [59] Iki N, Nakane R, Masuya-suzuk A, et al. MRI Contrasting Agent Based on n-MOF-74 Nanoparticles with Coordinatively Unsaturated Sites. *Molecular*

- Imaging and Biology, 2023, 25(5): 968-976.
- [60] Sun M, Chen G, Ouyang S, et al. Magnetic Resonance Diagnosis of Early Triple-Negative Breast Cancer Based on the Ionic Covalent Organic Framework with High Relaxivity and Long Retention Time. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(21): 8267-8276.
- [61] Rastogi N, Tyagi N, Singh O, et al. Mn(II) based T1 and T2 potential MRI contrast agent appended with tryptamine: Recognition moiety for A β -plaques. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2017, 177: 76-81.
- [62] Zhao G, Wu H, Feng R, et al. Bimetallic Zeolitic Imidazolate Framework as an Intrinsic Two-Photon Fluorescence and pH-Responsive MR Imaging Agent. *ACS Omega*, 2018, 3(8): 9790-9797.
- [63] Premrudee P, Barbara R G, Alexandri H, et al. Multimodal Prussian blue analogs as contrast agents for X-ray computed tomography. *Dalton Transactions*, 2018: 10.1039.
- [64] Liu R, Jing L, Peng D, et al. Manganese (II) Chelate Functionalized Copper Sulfide Nanoparticles for Efficient Magnetic Resonance/Photoacoustic Dual-Modal Imaging Guided Photothermal Therapy. *Theranostics*, 2015, 5(10): 1144-1153.
- [65] Xu P, Wen C, Gao C, et al. Near-Infrared-II-Activatable Self-Assembled Manganese Porphyrin-Gold Heterostructures for Photoacoustic Imaging-Guided Sonodynamic-Augmented Photothermal/Photodynamic Therapy. *ACS Nano*, 2024, 18(1): 713-727.
- [66] Yang Y, Chao Y, Liu J, et al. Core-shell and co-doped nanoscale metal-organic particles (NMOPs) obtained via post-synthesis cation exchange for multimodal imaging and synergistic thermo-radiotherapy. *NPG Asia Materials*, 2017, 9(1): e344.
- [67] Bao J, Zu X, Wang X, et al. Multifunctional Hf/Mn-TCPP Metal-Organic Framework Nanoparticles for Triple-Modality Imaging-Guided PTT/RT Synergistic Cancer Therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 7687-7702.
- [68] Zhao H, Li T, Yao C, et al. Dual Roles of Metal–Organic Frameworks as Nanocarriers for miRNA Delivery and Adjuvants for Chemodynamic Therapy .

- ACS APPL MATER INTER, 2021, 13(5): 6034-6042.
- [69] Dasari S, Bernard Tchounwo P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 740: 364-378.
- [70] Zhao P, Liu M-C, Zheng M, et al. G-quadruplex DNA interactions, docking and cell photocytotoxicity research of porphyrin dyes. *Dyes and Pigments*, 2016, 128: 41-48.
- [71] 宇文利霞, 孔应利, 时绘绘. 铂类抗癌药毒性及其与药物化学结构的关系[J]. *临床合理用药杂志*, 2017, 10(6):2.
- [72] Gimenez-Marques M, Hidalgo T, Serre C, et al. Nanostructured metal-organic frameworks and their bio-related applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 2016, 307: 342-460.
- [73] Horcajada P, Gref R, Baati T, et al. Metal-Organic Frameworks in Biomedicine. *Chemical Reviews*, 2012, 112(2): 1232-1268.
- [74] Jia X, Zhang Y, Zou Y, et al. Dual Intratumoral Redox/Enzyme-Responsive NO-Releasing Nanomedicine for the Specific, High-Efficacy, and Low-Toxic Cancer Therapy. *Adv Mater*, 2018, 30(30): e1704490.
- [75] Ma X, Chen B, Wu H, et al. A tumour microenvironment-mediated Bi₂-MnxO₃ hollow nanospheres via glutathione depletion for photothermal enhanced chemodynamic collaborative therapy. *Journal of Materials Chemistry, B. materials for biology and medicine*, 2022, 10: 3452-3461.
- [76] Lin X, Zhu R, Hong Z, et al. GSH-Responsive Radiosensitizers with Deep Penetration Ability for Multimodal Imaging-Guided Synergistic Radio-Chemodynamic Cancer Therapy. *Adv Funct Mater*, 2021, 31(24): 2101278.
- [77] Liu Y, Wang J. Multivalent metal catalysts in Fenton/Fenton-like oxidation system: A critical review. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 466: 143147.
- [78] Cao W, Jin M, Yang K, et al. Fenton/Fenton-like metal-based nanomaterials combine with oxidase for synergistic tumor therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 325.
- [79] Cheng M, Lai C, Liu Y, et al. Metal-organic frameworks for highly efficient heterogeneous Fenton-like catalysis. *Coordination Chemistry Reviews*, 2018, 368: 80-92.

- [80] Wang J, Qu C, Shao X, et al. Carrier-free nanoprodrug for p53-mutated tumor therapy via concurrent delivery of zinc-manganese dual ions and ROS. *Bioactive Materials*, 2023, 20: 404-417.