

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2210530129

酸敏型ZIF-8负载辣椒素载药体系的构建及钙超载抗肿瘤研究

Construction of acid-sensitive ZIF-8 loaded capsaicin-loaded drug system and study of calcium overload against tumor

学生姓名: 郜远

校内导师: 陶玉贵 (教授)

校外导师: 堵国成 (教授)

专 业: 生物与医药

研究方向: 生物载体材料

论文答辩日期: 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：郜远

日期：2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：鄢远

日期：2024年5月30日

指导教师签名：181.2

日期：2024年5月30日

ZIF-8 负载辣椒素酸敏载药体系的构建及钙超载抗肿瘤研究

摘 要

癌症已经成为了人们生命健康的重要威胁之一，癌症的治疗手段也从传统的手术治疗、化疗、放射治疗发展到现在新型的治疗手段，而钙超载疗法在新型治疗方法中得到了越来越多的关注。

钙超载疗法是指在胞内 Ca^{2+} 超载的情况下，致使线粒体损伤从而导致凋亡因子通过开放的线粒体通透性孔不受控制地释放到细胞质中。基于此，凭借其疗效好、副作用小在肿瘤学领域中发挥着越来越重要的作用，然而癌细胞自身的钙稳态调节，肿瘤部位钙离子不足和钙进入肿瘤的效率不高，其疗效受到限制，导致治疗效果不理想。本课题以金属有机框架沸石咪唑框架-8 (zeolitic imidazole framework-8, ZIF-8) 为药物递送系统的载体，合成了两种放大 Ca^{2+} 超载的纳米载药体系用于抗肿瘤研究，研究结果如下：

(1) 本文构建了一种能够从外源提供 Ca^{2+} 同时进行 pH 可控的降解和药物释放的新型 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米载药体系。该纳米材料可以激活 TRPV1 通道并提供外源钙离子引起 Ca^{2+} 超载造成细胞凋亡，从而达到治疗效果。通过仿生矿化法合成了以牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 为模板的磷酸钙 (Tricalcium phosphate,

TCP) 纳米球作为药物载体，最外层用 ZIF-8 包裹，制备出 CAP/BSA@TCP-ZIF-8。由于肿瘤部位微酸环境的特点，ZIF-8 响应性释放包裹其中的磷酸钙和 CAP。应用一些基本的表征手段（扫描电镜、透射电镜、Zeta 电位粒度仪、紫外光谱仪和傅里叶红外光谱仪等）进行表征。表征结果表明合成了平均粒径为 270 nm 的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料，CAP 的载药率为 $9.79 \pm 1.87\%$ 。在体外细胞毒性实验中，当 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的浓度为 $160 \mu\text{g/mL}$ 时，对 HepG2 细胞的抑制率达到 80%。对 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 组处理的 HepG2 细胞中的钙离子进行检测，细胞中 Ca^{2+} 含量明显高于其他组，几乎是对照组的 6 倍。证明该材料造成细胞 Ca^{2+} 超载从而杀死细胞。在小鼠体内实验中，通过 IVIS 捕获 cy 5 荧光探针标记 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的体内荧光图像，验证该材料能够有效富集在肿瘤区域。肿瘤模型的构建和治疗，说明了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 NPs 可以有效抑制小鼠的肿瘤生长。

(2) 本文在酸敏型 ZIF-8 载药体系的基础上，构建了一种能够精确靶向肿瘤同时提供内源 Ca^{2+} 的钙超载治疗纳米载药体系 CAP/NAADP@ZIF-8-FA。以 ZIF-8 为药物载体，通过静电吸附作用包裹住 CAP 和烟酸腺嘌呤二核苷酸磷酸（Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, NAADP）。最后用叶酸（folic acid, FA）修饰 ZIF-8 表面，制备出 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒。通过一些基础表征仪器进行表征。表征结果表明 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米材料的平均粒径为 280 nm，NAADP 在 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 中的

载药率为 $8.0 \pm 0.489\%$ 。在体外抗肿瘤活性研究中，当 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 的浓度达到 $320\mu\text{g/mL}$ 时，可致 89% 的 HepG2 细胞死亡。CAP/NAADP@ZIF-8-FA 处理后的 HepG2 细胞，胞内的 Ca^{2+} 含量显著增加。这些结果在细胞水平上表明了 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 能够放大 HepG2 细胞内的 Ca^{2+} 浓度，从而造成钙超载导致细胞凋亡。

综上所述，本研究设计了两种基于钙超载治疗的纳米载药体系，一种从外源提供 Ca^{2+} 的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料和一种从内源钙库释放 Ca^{2+} 的 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米材料。通过表征实验、体外实验和体内实验证明了这两种纳米载药体系均能放大细胞内 Ca^{2+} 浓度达到钙超载，具有优异的抗肿瘤效果。本研究对纳米载药体系与钙超载结合抗肿瘤方面提供了一定的参考价值。

关键词：辣椒素，ZIF-8，磷酸钙，叶酸，烟酸腺嘌呤二核苷酸磷酸，钙超载，pH 响应

CONSTRUCTION OF ACID-SENSITIVE ZIF-8 LOADED CAPSAICIN-LOADED DRUG SYSTEM AND STUDY OF CALCIUM OVERLOAD AGAINST TUMOR

ABSTRACT

Cancer has become one of the important threats to people's life and health, and the treatment of cancer has also developed from traditional surgery, chemotherapy and radiation therapy to new therapeutic methods, and calcium overload therapy has received more and more attention in the new therapeutic methods.

Calcium overload therapy refers to the condition of intracellular Ca^{2+} overload, which causes mitochondrial damage and leads to the uncontrolled release of apoptotic factors into the cytoplasm through the open mitochondrial permeability pore. Based on this, it is playing an increasingly important role in the field of oncology due to its good efficacy and small side effects. However, the regulation of calcium homeostasis by cancer cells themselves, insufficient calcium ions in tumor sites and low efficiency of calcium entering tumor have limited its efficacy, resulting in unsatisfactory therapeutic effect. This topic with metal organic framework zeolite imidazole framework-8 (ZIF-8) as the

carrier of drug delivery system, enlarge synthesized by two kinds of Ca^{2+} overload for antitumor drug nanoparticles system research, the results are as follows:

(1) In this paper, a novel CAP/BSA@TCP-ZIF-8 nanoparticle drug carrier system capable of providing Ca^{2+} from exogenous sources for both PH-controlled degradation and drug release was constructed. The nanomaterial can activate TRPV1 channel and provide exogenous calcium ions to cause Ca^{2+} overload and apoptosis, thus achieving therapeutic effect. Tricalcium phosphate (TCP) nanospheres using Bovine serum albumin (BSA) as a template were synthesized by biomimetic mineralization method. CAP/BSA@TCP-ZIF-8 was prepared by wrapping the top layer with ZIF-8. Due to the characteristics of the slightly acidic environment at the tumor site, ZIF-8 responds to release the calcium phosphate and CAP contained therein. Some basic characterization methods (scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, Zeta potential particle size analyzer, ultraviolet spectrometer and Fourier infrared spectrometer, etc.) were used for characterization. The results showed that CAP/BSA@TCP-ZIF-8 nanomaterials with an average particle size of 270nm were synthesized, and the drug loading rate of CAP was $9.79 \pm 1.87\%$. In vitro cytotoxicity tests, the inhibition rate of HepG2 cells reached 80% when the concentration of CAP/BSA@TCP-ZIF-8 was $160 \mu\text{g/mL}$. Calcium ions in

HepG2 cells treated with CAP/BSA@TCP-ZIF-8 were detected, and Ca^{2+} content in cells was significantly higher than that in other groups, almost 6 times that of control group. The material was shown to overload cells with Ca^{2+} and thus kill cells. In vivo experiments in mice, in vivo fluorescence images of CAP/BSA@TCP-ZIF-8 labeled by cy5 fluorescent probe were captured by IVIS, which verified that the material can effectively accumulate in tumor areas. The construction and treatment of tumor model indicate that CAP/BSA@TCP-ZIF-8NPs can effectively inhibit tumor growth in mice.

(2) Based on the acid-sensitive ZIF-8 drug carrier system, a calcium overload treatment nano drug carrier system CAP/NAADP@ZIF-8-FA was constructed, which can precisely target tumors and provide endogenous Ca^{2+} . ZIF-8 as drug carrier, wrapped in through electrostatic adsorption CAP and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP). Finally, CAP/NAADP@ZIF-8-FA nanoparticles were prepared by modifying the surface of ZIF-8 with folic acid (FA). It was characterized by some basic characterization instruments. The results showed that the average particle size of CAP/NAADP@ZIF-8-FA was 280nm, and the drug loading rate of NAADP in CAP/NAADP@ZIF-8-FA was $8.0 \pm 0.489\%$. In vitro studies of antitumor activity, CAP/NAADP@ZIF-8-FA could induce 89% death of HepG2 cells at a concentration of $320 \mu\text{g/mL}$. Intracellular Ca^{2+} content of

HepG2 cells was significantly increased after treatment with CAP/NAADP@ZIF-8-FA. These results suggest that CAP/NAADP@ZIF-8-FA can amplify Ca^{2+} concentration in HepG2 cells, resulting in calcium overload and apoptosis.

In summary, two nanodrug delivery systems based on calcium overload therapy were designed in this study: a CAP/BSA@TCP-ZIF-8 nanomaterial that provides Ca^{2+} from exogenous sources and a CAP/NAADP@ZIF-8-FA nanomaterial that releases Ca^{2+} from endogenous calcium pools. Through characterization, in vitro and in vivo experiments, it has been proved that these two nano drug delivery systems can amplify intracellular Ca^{2+} concentration to achieve calcium overload and have excellent anti-tumor effects. This study provides a certain reference value for the combination of nano-loaded drug system and calcium overload in anti-tumor.

KEY WORDS: capsaicin, ZIF-8, calcium phosphate, folic acid, adenine dinucleotide niacin phosphate, calcium overload, pH response

目录

摘 要	I
ABSTRACT	IV
目录	VIII
第 1 章绪论	1
1.1 引言	1
1.2 癌症治疗方法	2
1.2.1 新型癌症治疗方法	2
1.3 Ca^{2+} 超载疗法	4
1.3.1 外源性 Ca^{2+} 介导的 Ca^{2+} 超载	5
1.3.2 内源性 Ca^{2+} 介导的 Ca^{2+} 超载	7
1.3.3 纳米载体在 Ca^{2+} 超载治疗中的应用	9
1.6 课题设计与研究内容	11
1.6.1 课题设计思路	11
1.6.2 课题研究内容	12
第 2 章 ZIF-8 负载 CAP/TCP 的载药体系构建及其抗肿瘤研究	13
2.1 引言	13
2.2 实验材料与方法	14
2.2.1 实验材料	14
2.2.4 实验方法	15
2.3 结果与讨论	19
2.3.1 表征	19
2.3.2 体外材料活性实验	23
2.3.3 体内抗肿瘤活性实验	30
2.4 本章小结	35
第 3 章 ZIF-8 负载 CAP/NAADP 的体系的制备及其抗肿瘤研究	37
3.1 引言	37
3.2 实验材料与方法	38
3.2.1 实验材料	38
3.2.2 试验方法	39
3.3 结果与讨论	42
3.3.1 表征	42
3.3.2 体外材料活性分析	45
3.4 本章小结	48
第 4 章结论与展望	50
4.1 结论	50
4.2 展望	51
参考文献	52

第 1 章绪论

1.1 引言

癌症对发展中国家和发达国家的健康和经济造成越来越大的负担。每年新发癌症病例的数量和死亡率都在急剧增加。目前,治疗策略包括手术切除、化疗、放疗和免疫治疗^[1-3]。然而,尽管有这些选择,预后结果仍然很差,5 年生存率很低。因此,迫切需要寻求新的治疗方法。近年来,先进的生物技术的出现和跨学科的整合为癌症的治疗提供了创新的方法。癌症前期的治疗通常是手术切除肿瘤,辅以辅助治疗。相反,当疾病进展到中后期时,治疗转向化疗或放疗。然而,几乎所有的传统化疗药物都有相同的局限性^[4],包括非特异性靶向、低生物利用度和耐药性的发展,这限制了它们在癌症治疗中的疗效。

研究发现细胞内离子在细胞代谢和增殖中起着关键作用,越来越多的研究发现,离子稳态失衡可能导致细胞功能异常,甚至细胞死亡^[5,6]。例如,高水平的 Zn^{2+} 可能会因能量耗尽而使细胞饥饿^[7]。 Ca^{2+} 超载可激活线粒体凋亡通路,导致细胞损伤^[4]。离子干扰策略作为一种治疗癌症的有效手段值得充分肯定。

由于异常的生长和代谢,肿瘤组织具有独特的微环境特征,如低 pH、乏氧、高谷胱甘肽(GSH)含量等^[8]。此外,大多数实体瘤常存在血管密度高、高致密性的特点,可使尺寸介于 20-200 nm 的纳米粒子易渗透进入肿瘤组织并在此长期滞留^[9]。基于此,肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)刺激响应型纳米递药系统被广泛研究,如 pH 响应型、 H_2O_2 响应型等。同时纳米给药系统由于其独特的特性,可以将治疗剂包裹起来,防止其降解,不仅可以将抗癌药物准确地递送到肿瘤部位,还可以减少对正常组织的非特异性伤害,从而提高抗癌效果。纳米药物给药系统结合离子干扰法提供了一种替代传统化疗多副作用治疗的方法,是癌症治疗领域值得探索的治疗方法。

1.2 癌症治疗方法

1.2.1 新型癌症治疗方法

(1) 化学动力学疗法

化学动力学疗法 (Chemodynamic Therapy, CDT) 是一种新型的肿瘤治疗技术, 利用肿瘤微环境激活纳米药物芬顿反应来产生强氧化性羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$), 以实现肿瘤的特异性治疗^[10]。该技术于 2016 年由步文博教授和施剑林院士团队提出^[11], 并在国际医学界引起了广泛关注。与传统肿瘤治疗技术不同, CDT 充分结合了芬顿化学、纳米科学和肿瘤医学, 为解决临床肿瘤治疗难题提供了全新的思路^[12]。活性中间产物 $\cdot\text{OH}$ 在连接 CDT 化学反应和生物学效应方面具有关键作用。因此, CDT 可以被分解为以下两个动力学过程: (1) 化学动力学过程, 包括所有与纳米材料生成 $\cdot\text{OH}$ 相关的化学反应; (2) 生物动力学过程, 包括所有涉及 $\cdot\text{OH}$ 的胞内生化反应以及相应细胞响应行为。这两个过程之间存在时序性动态相互作用, 其中包括纳米材料与细胞之间的相互作用、纳米材料与胞内分子之间的相互作用以及分子与细胞之间的相互作用。这些交互作用构成了 CDT 过程中“动力学”特征的核心体现。图 1-1 总结了化学动力疗 (CDT) 概念与化学和生物动态过程的关系。然而, 内源性 H_2O_2 的含量并不足以进行有效的化学动力学反应限制了 CDT 的治疗效果。

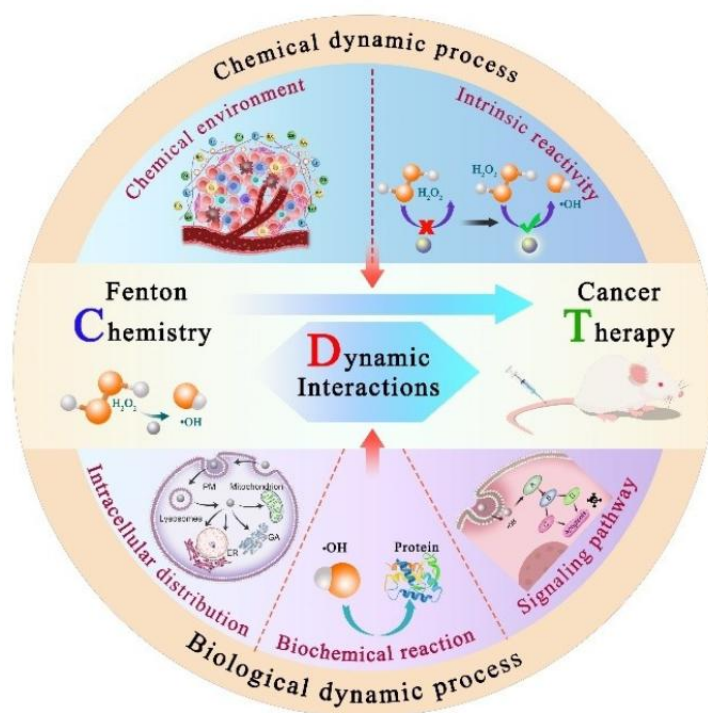


图 1-1.化学动力疗（CDT）概念与化学和生物动态过程的关系概述^[10]

Figure1-1. Overview of the chemodynamic therapy (CDT) concept in relation to chemical and biological dynamic processes

（2）光动力疗法

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)又称为光辐射疗法或光化学疗法(photochemotherapy),在医学领域,PDT是一种创新的治疗方法^[13]。它利用光敏剂对靶细胞的特异性聚集能力,在特定波长的光照射下,有效地杀伤癌细胞。当光敏剂吸收光子能量后,部分电子被激发至高能态,这个过程称为光激发。受激发的光敏剂将吸收的能量传递给氧分子,导致氧分子氧化并产生活性氧(ROS),如单线态氧($^1\text{O}_2$)、超氧自由基(O_2^-)、羟基自由基($\text{HO}\cdot$)和过氧化氢(H_2O_2)^[14]。这些细胞毒性光产物启动一系列生化事件,可诱导目标组织损伤和死亡。活性氧物质具有强大的氧化作用,可以通过攻击细胞内脂质、蛋白质和核酸等生物大分子来严重损伤细胞结构和功能^[15]。在持续进行的光动力治疗中,癌细胞不断遭受活性氧物质攻击而死亡。与此同时,由于正常细胞具备更强大的修复能力,它们可以有效抵御活性氧物质造成的损伤,并减少对正常细胞产生不良影响。因此,光动力疗法具有许多优势:手术创伤小、副作用轻微,并且可以选择性地杀灭癌细胞等特点使其在临床上得到广泛应用,在肿瘤治疗方面取得了显著效果。目前已经成功应用了光动力疗法来治疗多种类型的癌症如皮肤癌、口腔癌、食管癌和肺癌等。随着研究的深入和技术的进步,光动力疗法在未来有望为更多的癌症患者带来希望。

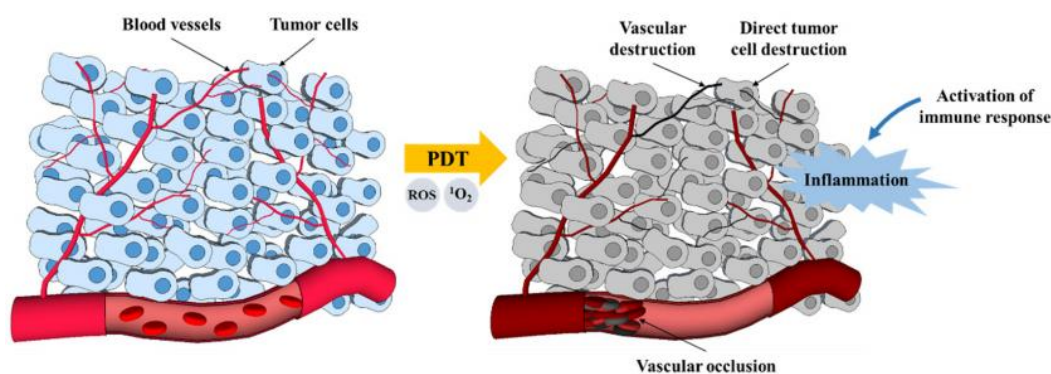
图 1-2.PDT 对肿瘤的破坏机制^[16]

Figure 1-2. PDT mechanisms for tumor destruction

(3) 光热疗法

光热治疗 (photothermal therapy, PTT) 是一种新型的无创性肿瘤治疗方法, 利用光热转换剂 (photothermal agent, PTA) 在近红外光 (near-infrared, NIR) 等外部光源的作用下, 将光能转化为热能来杀伤肿瘤细胞^[17]。然而, 单纯使用 PTT 也存在一些限制, 比如无法完全消灭整个肿瘤组织、对周围正常组织可能造成损伤以及光热材料的生物安全性问题。

为了解决这些局限性, 人们广泛开展了对新型治疗方案的研究, 其中包括、基因治疗、免疫治疗和钙超载治疗等方法。钙超载疗法凭借其副作用小, 生物安全性高, 得到广泛关注。

1.3 Ca^{2+} 超载疗法

细胞代谢和增殖过程中, 离子在细胞内扮演着至关重要的角色。越来越多的研究表明, 如果离子稳态失衡, 则可能导致细胞功能异常, 并且有可能会引发细胞死亡^[18-20]。线粒体作为细胞内的“发电厂”, 不仅能够为细胞提供三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 来支持其活动, 还承担着重要的调节功能^[21-23]。ATP 几乎与体内的每一个反应都有关, 是生物体生存所必需的。在细胞内 Ca^{2+} 以组织特异性的方式通过多种专门通道和转运体进入和离开线粒体^[24], 线粒体可以在其基质中积累大量的 Ca^{2+} 。虽然相对较低的 Ca^{2+} 含量 ($0 < 40 \text{ nmol/mg}$ 线粒体) 对能量产生至关重要, 但高水平的 Ca^{2+} 含量 ($> 500 \text{ nmol/mg}$) 会导致能量稳态的完全崩溃, 从而导致细胞凋亡^[25]。也就是说, Ca^{2+} 在细胞内也是一个重要的调节因子。在线粒体中 Ca^{2+} 浓度上升会有效地促进电子传递链 (ETC) 过程, 并且通过干扰线粒体膜电位而导致细胞凋亡^[4]。然而, 在实现在线粒体基质中 Ca^{2+} 积累时需要考虑 Ca^{2+} 在在线粒体外膜 (OMM) 和在线粒体内膜 (IMM) 之间转移问题^[26]。OMM 中 Ca^{2+} 转移依赖于电压依赖性阴离子通道; IMM 中则受到限制并由单向转运载体进行调节处理; 同时在实现在线粒体摄取过程时也需要借助于 MAMs 提供基于 Ca^{2+} 微区域来保证其高效完成任务并确保大块细胞质处于稳定状态下工作运行。

在癌细胞中, 线粒体的 Ca^{2+} 稳态需要保持平衡^[27], 以确保 ATP 供应正常并防止 Ca^{2+} 超载导致细胞死亡。相比于正常细胞, 癌细胞对于 Ca^{2+} 调节更加敏感, 因为它们更频繁地接收到 Ca^{2+} 信号。此外, 内质网向线粒体释放 Ca^{2+} 对于癌细胞

至关重要。这两个细胞器之间的紧密联系有助于促进能量代谢，并提高癌细胞的存活率。然而，这种结构上的亲密性也增加了外源性物质引起的 Ca^{2+} 过载风险。在线粒体 Ca^{2+} 超载的情况下， Ca^{2+} 和凋亡因子会通过开放的线粒体通透性孔不受控制地释放到细胞质中。基于此， Ca^{2+} 超载已被发展为一种多机制实现肿瘤消除的有效策略^[28]。图 1-3 为 Ca^{2+} 过载损伤机制示意图。

有两种方式可以调动和提高离子水平，一是增强内源离子的积累，二是外源离子的传递。因此开发综合干扰离子的纳米平台对肿瘤治疗具有重要意义。

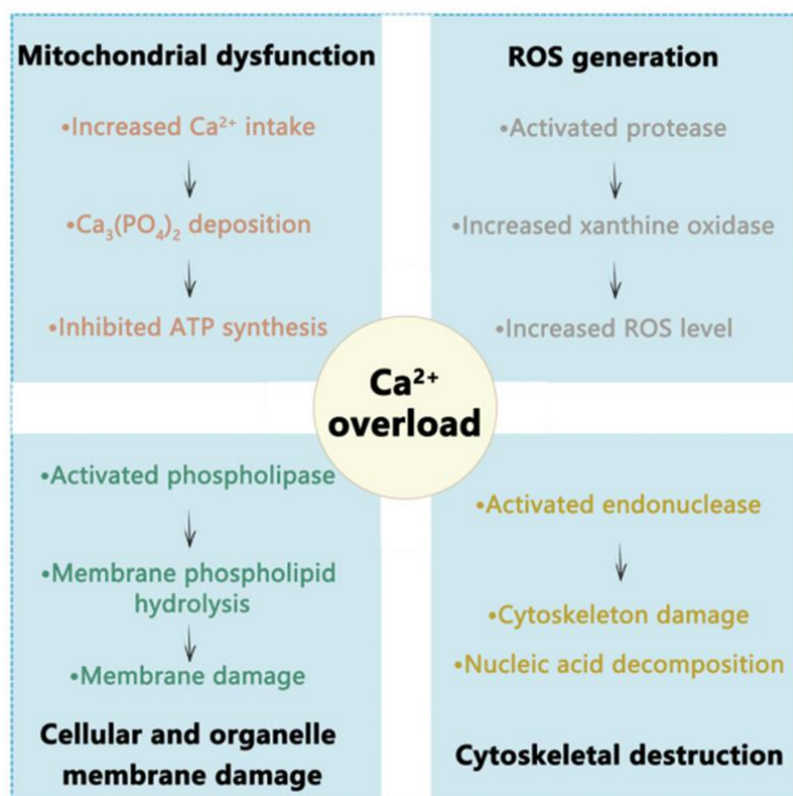


图 1-3. Ca^{2+} 过载损伤机制示意图^[28]

Figure 1-3. Schematic diagram of the Ca^{2+} overload damage mechanisms

1.3.1 外源性 Ca^{2+} 介导的 Ca^{2+} 超载

外源性 Ca^{2+} 通常来源于钙基纳米材料，如碳酸钙(CaCO_3)、过氧化钙(CaO_2)和磷酸钙(CaP)^[29]。在肿瘤酸微环境中，这些物质释放出丰富的 Ca^{2+} ，诱导肿瘤细胞 Ca^{2+} 超载和线粒体功能障碍^[30]。

基于此，Zhang 等人^[31]开发了透明质酸钠修饰的过氧化钙纳米颗粒(SH-CaO_2 NPs)如图 1-4 所示，在弱酸性肿瘤微环境下降解释放大量外源 Ca^{2+} ，从而触发细胞内 Ca^{2+} 超载，造成细胞凋亡。Liu 等人^[32]制备了一种钙离子含量特别高的可分

解羟基磷灰石超薄纳米片 (HAP-PDCns), 一旦 HAP 完全分解, 将会释放大量的外源 Ca^{2+} , 从而造成胞内 Ca^{2+} 超载导致细胞凋亡从而杀死癌细胞。因此, 纳米平台通过向细胞内释放大量的钙离子从而破坏钙稳态介导的 Ca^{2+} 超载是癌症治疗的有效模型。Pan 等人^[33]提出了一种新的表面功能化策略, 用于用磷酸钙 (tricalcium phosphate, TCP) 原位矿化黑磷纳米片 (BPns) 以增强 Ca^{2+} 超载。BP 作为生长模板通过原位沉积磷酸钙, 从而提高生物活性和治疗剂负载效率。在生理条件下, TCP 相对稳定, 可有效避免载药过早渗漏。此外, Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 离子可以参与生物体的正常代谢, 减少了对其他正常细胞的损伤增强了生物安全性。但这种治疗模式受到细胞自身的钙离子排泄保护机制^[34, 35]的阻碍, 需要进一步完善。因此, 干扰钙稳态的药物在 Ca^{2+} 超载治疗中显示出很大的希望。例如 Zheng 等人^[36]以聚多巴胺(PDA)为模板制备了碳酸钙(CaCO_3)纳米载体, 用于共载姜黄素(CUR)和顺铂(CDDP), CUR 有效地抑制钙离子的排泄, 从而破坏钙稳态放大 Ca^{2+} 超载。最近, 化疗联合 Ca^{2+} 超载在肿瘤消除中显示出令人满意的价值。Sun 等人开发了一种 TME 响应纳米平台, 包括 CaO_2 、ZIF-8、阿霉素 (doxorubicin, DOX) 和透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 该纳米平台内化到癌细胞后, HA 层和 ZIF-8 分别被透明质酸酶和氢离子降解, 从而释放出 DOX、 H_2O_2 和 Ca^{2+} 。一方面, 生成的 H_2O_2 使细胞更容易进入稳态不平衡状态。另一方面, DOX 作为临床应用的药物, 对 DNA 造成损伤, 放大氧化应激, 进一步与 Ca^{2+} 超载诱导的细胞凋亡协同作用, 提高治疗效果。

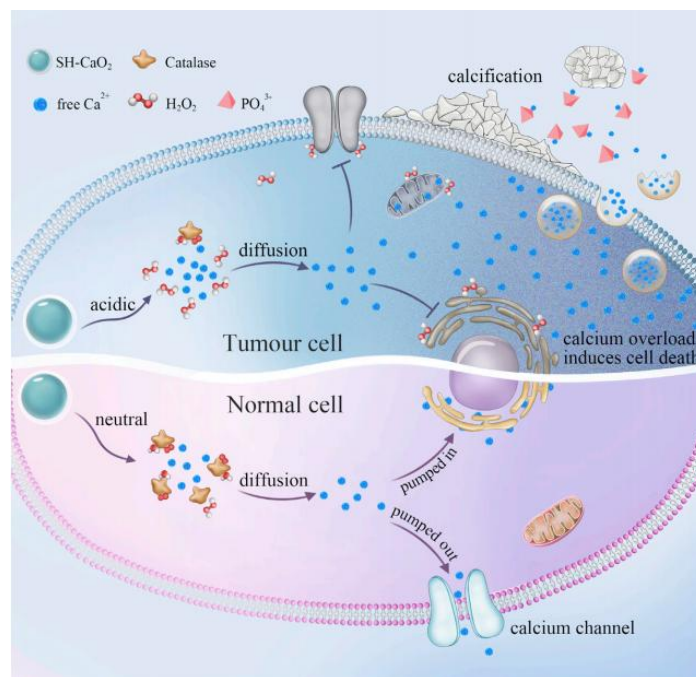


图 1-4. SH-CaO₂ NPs 的功能模式示意图^[31]

Figure 1-4. Schematic Representation of the Functional Pattern of SH-CaO₂ NPs

辣椒素 (capsaicin, CAP) 可以用来激活钙离子通道^[37]造成钙离子内流破坏钙稳态。辣椒素是从辣椒中提取的一种辛辣物质, 是一种瞬时感受器电位香草酸受体 1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)激动剂, 被发现是一种有效的抗癌剂, 在多种癌细胞中表现出抗增殖和促凋亡特性^[38, 39]。TRPV1 是一种非选择性阳离子通道, 是 20 世纪 80 年代发现的一种特异性结合配体^[40], 可被高温、低 pH 和多种化学刺激激活^[41-43], 尤其是辣椒素^[44]。因此, 辣椒素可以激活细胞表面的 TRPV1 通道, 使细胞内钙离子浓度超载, 引起细胞凋亡。辣椒素处理通过 TRPV1 激活触发 Ca²⁺流入, 导致细胞内钙稳态失衡。快速增加的细胞溶质 Ca²⁺浓度反映在线粒体中, 并导致癌细胞中线粒体 Ca²⁺超载的严重状况。辣椒素引起的线粒体钙稳态破坏导致癌细胞线粒体功能障碍。接下来, 由此产生的细胞色素 C (cyt c) 释放到胞质溶胶中触发了凋亡小体组装和随后的半胱天冬酶激活和凋亡。

1.3.2 内源性 Ca²⁺介导的 Ca²⁺超载

不幸的是, 外源性钙不可避免地会引起血浆钙的急性升高, 进而引发炎症反应的增加^[45]。利用癌细胞内的毒性内源性钙是一种理想的方法, 可以避免副作用和对身体的系统性毒性。钙在细胞内主要储存在内质网 (endoplasmic reticulum,

ER) 和肌浆网 (sarcoplasmic reticulum, SR) 中, 为细胞的主要“钙库”^[46-48], 细胞内还有一些非 ER 储存形式的钙, 介导细胞活动和信号级联反应。

Chu 等人^[49], 构建了一个可控的钙离子调节纳米平台 (UCNPs) 如图 1-4。在近红外(NIR)光照射下, 能够产生 NO 同时释放钙泵抑制剂(berbamine, BER), 亲脂性 NO 侵入过表达的调节型兰尼碱受体 (RyRs), RyRs 受体允许钙离子进入细胞内, 而 BER 则抑制钙离子的排泄, 实现协同破坏钙稳态导致 Ca^{2+} 超载。Zheng 等人^[50]制备了 Ca^{2+} 增强剂(PEGCaCUR)。PEGCaCUR 可以作为 Ca^{2+} 纳米调节剂诱导高效的线粒体 Ca^{2+} 超载, 其中姜黄素^[51] (curcumin, CUR), 可以通过促进 Ca^{2+} 从内质网释放到细胞质和抑制 Ca^{2+} 从细胞质向细胞外区室的外流来增加线粒体中的 Ca^{2+} 浓度线粒体 Ca^{2+} 超载诱导线粒体功能障碍、caspase-3 上调和随后的细胞凋亡。

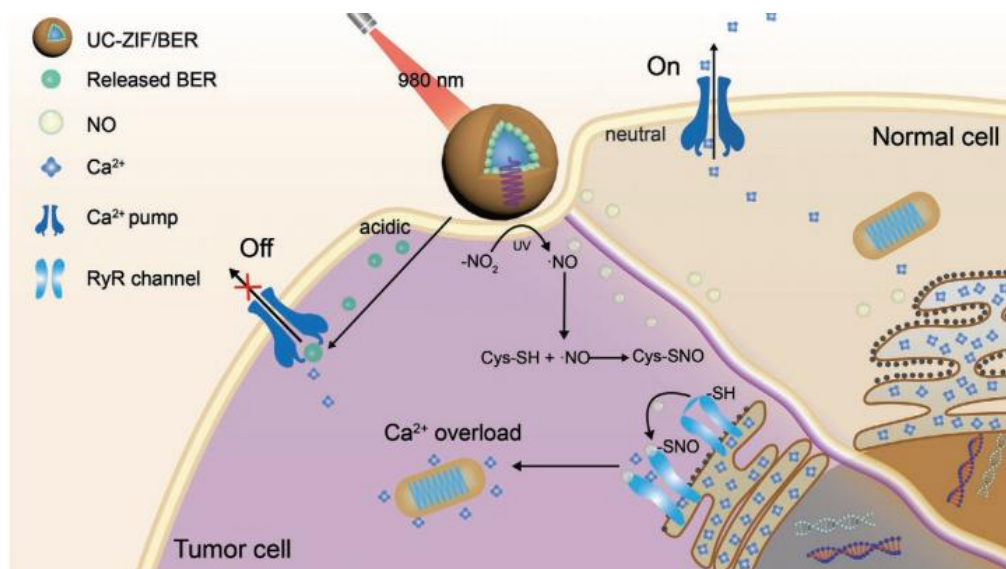


图 1-5. 细胞内钙储存的示意图由 NO 调节的 Ca^{2+} 发起的癌症治疗^[49]

Figure 1-5. Schematic diagram of intracellular calcium stores modulated by NO for Ca^{2+} -initiated cancer therapy

传统观念中药效是由药物分子的化学结构及性质决定, 药剂学的发展及其对药物关键性的辅助作用却说明了药物的给药方式及剂型亦是影响药效的重要因素^[52]。药物在体内的吸收和代谢主要由给药方式决定, 为药物研制适宜的载体、剂型和给药方式, 药效才能在最佳时机和位置发挥最大效力^[53]。

1.3.3 纳米载体在 Ca^{2+} 超载治疗中的应用

传统上, 药物递送方法基于两种类型的载体, 有机或无机。有机载体^[54, 55], 如脂质体、胶束和聚合体, 被用来包封治疗药物。它们具有生物相容性和可生物降解性, 并且可以进行化学修饰以改善其释放特性并增加其在肿瘤部位的积累。第二种类型的纳米载体^[56, 57], 即无机载体, 如氧化铁纳米颗粒(NPs)、碳纳米管、量子点等, 它们可以与治疗分子结合, 可以为药物吸附提供较大的表面积。纳米载体可在传统的药物治疗上放大药物优点, 同时规避缺点, 如减缓不良反应、避免血药浓度波动、改善溶解性等^[53]。

尽管纳米材料的规模有限, 但它具有特殊的物理化学功能, 使得纳米结构具有比大多数纳米材料本身更大的表面-体积关系。由于其广泛的可用表面积, 一些分子, 包括小分子药物、探针、RNA、DNA 和蛋白质, 可以通过纳米结构附着、吸收和运输^[58, 59]。纳米材料的可控尺度、表面和结构特征进一步使其具有优异的耐用性、极大的体积、亲疏水材料的内置功能以及多种给药途径的通用性^[60, 61]。如图 1-6 所示根据其合成方法和结构可以与细胞产生独特的相互作用。

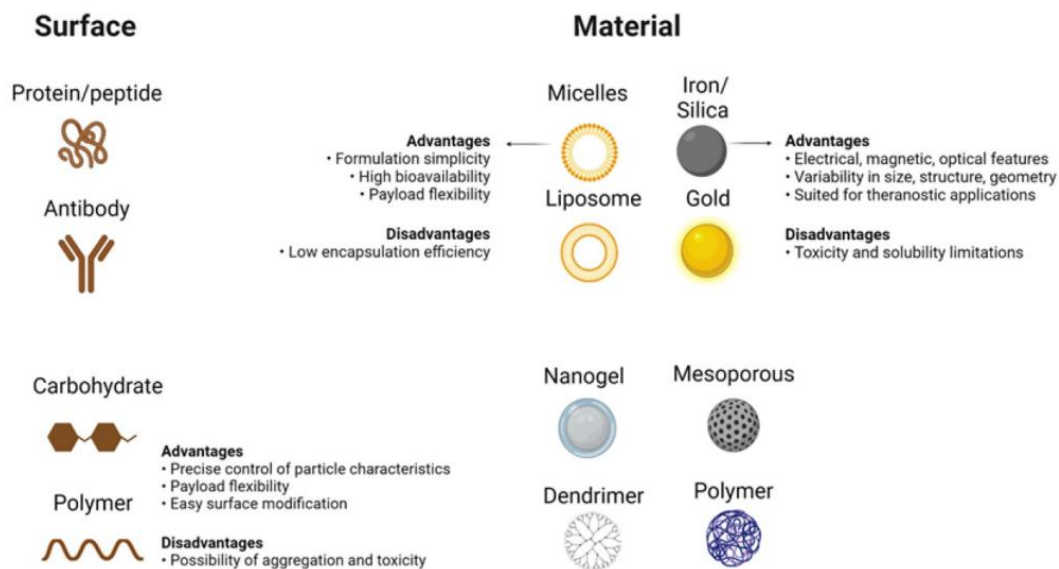


图 1-6. 纳米粒子的主要特征, 根据纳米材料在癌症治疗中的应用方法, 设计纳米结构有不同的选择, 不同的纳米粒子表面涂层(左图), 不同的材料设计的纳米粒子(右图), 以及它们的一些一般性质^[62]

Figure 1-6. Main Features of Nanoparticles, different choices available to design a nanostructure based on what method is used to apply the nanomaterial in cancer therapy,

different surface coatings of nanoparticles (left side), different materials available to design nanoparticles (right side), and some of their general properties are shown

(1) 提高生物相容性和稳定性

大部分应用于钙超载的药物都是有机化合物,它们的水溶性和生物相容性较差,这也导致了它们无法到达肿瘤区域发挥作用。纳米载药体系的构建可以在内部形成亲脂囊腔来封装药物,并且外部结构亲水,与生物组织更好地相容^[63]。通过纳米粒子高度分散和大表面积的特点,有利于增加药物与肿瘤细胞的接触面积。纳米载体负载药物既提高了药物的溶解度,同时也保持了药物自身的稳定性,使药物突破血液屏障到达肿瘤区域。

(2) 提高药物靶向性

靶向递送是纳米载药体系相对于单一药物的主要优势之一。靶向递送^[64]的作用旨在精确靶向特定的癌细胞,它可以通过被动靶向或主动靶向来实现。增强渗透滞留(enhanced permeability and retention, EPR)效应^[65]被用于被动靶向,而主动靶向是通过将纳米载体与抗体、多肽、适配子和小分子结合来实现的。与游离药物相比,靶向递送有助于降低药物对正常细胞的毒性,防止药物在中途降解,使药物精确靶向特定的癌细胞增强药效。

(3) 控制药物释放及刺激响应

钙超载药物在体内的维持时间较短将无法对癌细胞达到有效剂量和疗效。为了延长药物在体内循环的时间并减小血液中药物浓度的波动,纳米载体常选择水溶性和生物相容性优异的材料作为表层,并缓慢释放药物成分。例如金属有机框架(metal organic framework, MOF),它是一种过渡金属离子或金属簇与有机配体自组装相互链接,形成具有周期性结构的多孔材料,也称为配位聚合物^[66, 67]。MOF本身具有更大的比表面积及较高的孔隙率,又由于金属类型的多样性和配体不同的配位方式,结合形式非常复杂,展现出良好的多态性,同时也增加了MOF的可调节性^[68]。通过对MOF的表面修饰以及改性,可以增加其在生理环境下的稳定性、相容性、可降解性,实现药物缓释功能和靶向治疗的目的。具有大孔径和规则结构的多孔MOF可以实现高载药量,pH依赖性MOF材料可以很好的响应肿瘤区域弱酸的微环境和药物控制释放。

金属-有机框架已经作为有机/无机混合多孔材料出现,为许多生物医学应用打开了大门^[69-71](例如,药物输送、生物传感、生物成像及其作为抗菌剂的使用)。

MOF 的晶体结构提供了一种开放的多孔结构, 具有一些特殊和独特的性质, 如广泛的高内表面积($1000-7000 \text{ m}^2/\text{g}$), 高热稳定性(250 至 500°C), 低密度(最低密度报道为 $0.126 \text{ g}/\text{cm}^3$), 大孔体积(范围从 1.1 到 $4.4 \text{ cm}^3/\text{g}$), 永久孔隙^[72], 此外, 灵活的框架使其比其他传统多孔固体更有用。MOF 具有较大的表面积和孔体积, 使其能够有效地封装各种大小的生物分子, 在药物递送应用中更具吸引力。同时, MOF 可通过化学功能化和调控颗粒大小来设计高效的药物输送系统。基于 MOF 的药物输送系统可以实现双重治疗和诊断模式。通过调控 MOF 纳米载体的大小, 可以利用增强渗透性和滞留性现象提高靶向肿瘤区域治疗剂浓度。

1.6 课题设计与研究内容

1.6.1 课题设计思路

Ca^{2+} 超载疗法因其疗效好、副作用小在肿瘤学领域中收到越来越多的关注。而辣椒素 (CAP) 作为一种天然的小分子有机物, 能够激活瞬时感受器电位香草酸受体 1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)通道^[73]并触发肿瘤钙离子内流受到很多人的青睐。但由于肿瘤部位钙离子不足, 辣椒素对其他正常细胞也具有杀伤效果, 其疗效受到限制, 导致治疗效果不理想。而磷酸钙 (TCP) 作为一种钙基生物材料, 具有优异的生物相容性、生物活性和生物降解性, 同时可以作为优质的钙库提供钙离子。受这些概念的启发, 通过仿生矿化合成磷酸钙纳米颗粒, 将 CAP 装载到磷酸钙纳米颗粒中, 并用 ZIF-8 包裹, 用于肿瘤 Ca^{2+} 超载治疗。在这个治疗平台 (CAP/BSA@TCP-ZIF-8) 中, ZIF-8 外壳确保该纳米材料能够稳定到达肿瘤区域, 同时能够响应弱酸的肿瘤微环境发生崩解从而释放钙离子和 CAP。CAP 激活 TRPV1 通道造成钙离子内流有效打破钙平衡, 而大量释放的钙离子显著加剧和放大 CAP 介导的 Ca^{2+} 超载。因此, 线粒体的膜电位降低, 线粒体的功能被破坏, 导致癌细胞凋亡, 达到抗肿瘤的目的。

烟酸腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, NAADP) 是迄今为止已知最强的释放 Ca^{2+} 信使分子, 它可以激活细胞内肌质网 (sarcoplasmic reticulum, SR) 和内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 上的兰尼定受体 1(Ryanodine Receptor1, RYR1)通道使 Ca^{2+} 从 ER 中流入胞质, 造成胞质中 Ca^{2+} 浓度大幅提高^[74]。它直接从细胞自身的钙库中释放钙离子, 提供内源钙, 造成细胞内钙浓度升高。基于此本文设计了通过提供内源 Ca^{2+} 放大 Ca^{2+} 超载的酸纳

米载药体系 (CAP/NAADP@ZIF-8-FA) 从而在 Ca^{2+} 超载的基础上, 将外源钙替换成内源钙, 提高了钙的利用率减少胞外不必要的钙离子, 增强生物安全性, 进一步提高对肿瘤的治疗效果。相关表征证明了材料的成功合成, 并从细胞水平上验证了材料的治疗效果。综上所述, 本文设计了两种新型的酸敏型纳米载药体系, 分别通过提供内源钙和外源钙来放大 Ca^{2+} 超载从而达到抗肿瘤效果, 为高效、安全的治疗肿瘤提供了一种新的策略。

1.6.2 课题研究内容

本文以 Ca^{2+} 超载为基础, 设计了两种酸敏型纳米载药体系, 通过基础表征手段证明材料的成功合成, 并进一步研究其在体外和体内的抗肿瘤活性。具体研究内容如下:

(1) CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的设计合成及表征。通过仿生矿化以 BSA 为生物模板通过原位沉积磷酸钙形成 BSA@TCP 纳米球。随后将 CAP 通过静电吸附附着在纳米球上, 接着最外层用 ZIF-8 包覆, 合成 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒。利用相关表征手段验证 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的成功合成, 并表征了酸敏释放 CAP 和钙离子的能力。

(2) 研究 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在体内和体外的生物安全性和毒性, 以及影响 HepG2 细胞钙稳态的能力。

(3) 基于经尾静脉注射后, CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在体内的聚集情况。研究 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒对在腋下植入有 HepG2 细胞的荷瘤小鼠的肿瘤治疗效果, 并探究材料在体内的生物相容性和肿瘤内的钙离子浓度。

(4) ZIF-8 负载 CAP 和 NAADP, 同时在其表面修饰叶酸(FA), 提高其靶向性, 得到 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒。通过 SEM、UV-vis 和 FTIR 等方法进行表征, 结果表明, 成功合成 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米材料。通过细胞水平上研究 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 的放大 Ca^{2+} 超载和抗肿瘤效果。

第2章 ZIF-8 负载 CAP/TCP 的载药体系构建及其抗肿瘤研究

2.1 引言

癌细胞中，在维持异常增殖的 ATP 供应和防止 Ca^{2+} 超载诱导的死亡之间存在高度平衡的线粒体钙动态平衡^[75]。异常的细胞溶质钙离子浓度会反映在线粒体中，导致癌细胞线粒体活性氧(ROS)的产生、线粒体膜电位的去极化和线粒体通透性的开放^[76, 77]。钙超载造成了线粒体功能障碍，由此产生的凋亡因子触发了癌细胞的凋亡。基于此， Ca^{2+} 超载已被开发为一种有效抗肿瘤的新型治疗方法。

CAP 可以有效激活癌细胞表面的 TRPV1 通道，使 Ca^{2+} 内流，但其对正常细胞的毒性^[43]和肿瘤部位钙离子不足^[78]限制了它们在体内的生物活性和应用。因此增加肿瘤部位的钙浓度和赋予 CAP 特异性到达肿瘤组织的能力，是增强 Ca^{2+} 超载选择性和效率的重要方向。在其他治疗研究中 TCP 是一种钙基生物材料，由于其优异的生物相容性、生物活性和生物降解性，已被证明是一种出色的药物递送系统。有趣的是，TCP 的溶解度很大程度上取决于 pH 值。TCP 在生理条件下 (pH=7.4) 很少溶解，而随着 pH 的降低，其溶解度显著增加。TCP 的这一特性将非常有利于开发作为纳米颗粒抗癌药物的载体^[79]。金属有机骨架 (MOFs) 是一种新型多孔材料，因其具有可调节的孔隙结构和可修饰的孔隙环境等优点而受到材料科学和化学领域的广泛关注^[80-83]。纳米 MOF 具有载药效率高、生物可降解性好、生物毒性低等特点。因此，纳米 MOFs 被认为是生物大分子理想的纳米载体。ZIF-8 是一种常见的金属有机骨架，具有超高孔隙率、可调节结构、良好的生物相容性和 pH 诱导生物降解性^[84]。与其他 MOF 相比，ZIF-8 具有更好的生物相容性，因为它是由生理系统的成分组成的^[85]。

本文设计了一种能够选择性地靶向肿瘤细胞、进行 pH 可控的降解和药物释放的新型纳米载药体系 CAP/BSA@TCP-ZIF-8。该纳米材料可以激活 TRPV1 通道并提供外源钙离子引起 Ca^{2+} 超载造成细胞凋亡，从而达到治疗效果。通过仿生矿化法合成 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料。EPR 效应^[65]让 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料可在肿瘤部位积聚。肿瘤部位微酸环境的特点^[8]，使 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 响应性释放包裹其中的磷酸钙和 CAP，确保了 CAP 能

够靶向递送到肿瘤组织，减小了对其他正常细胞的损伤，并成功解决了肿瘤部位的钙离子供应。CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料实现了协同高效的 Ca^{2+} 超载癌症治疗，为癌症纳米药物设计和创新提供了一些新的思路。

2.2 实验材料与方法

2.2.1 实验材料

(1) 实验试剂

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 Experimental reagent

实验试剂	生产厂家
无水氯化钙(CaCl_2)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
牛血清白蛋白(BSA,96%)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
辣椒素(CAP, $\geq 95\%$)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
2-甲基咪唑(2-methylimidazole, 99%)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
六水硝酸锌($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98%)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
DMEM 培养基	武汉塞维尔生物科技股份有限公司
CCK-8 试剂盒	江苏凯基生物技术股份有限公司
细胞活死检测试剂盒	江苏凯基生物技术股份有限公司
线粒体膜电位测定试剂盒	上海泰坦科技股份有限公司
钙含量测定试剂盒	上海碧云天生物科技股份有限公司
Fluo-4 AM (钙离子荧光探针, 2mM)	上海碧云天生物科技股份有限公司

(2) 实验仪器

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental equipment

实验仪器	型号	生产厂家
扫描电子显微镜	S-4800	日本日立公司
紫外可见分光光度计	UV-3600	日本岛津公司
傅里叶红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
Zeta 电位粒度仪	Nano Brook 90PlusPALS	美国 Brook haven 公司
全波长酶标仪	INFINITE 200 PRO	美国 TECAN 公司
高速冷冻离心机	Z326k	德国赫姆勒公司
荧光显微镜	DM2500 LED	德国莱卡公司
流式细胞仪	CytoFLEX	贝克曼公司
CO ₂ 培养箱	4111	赛默飞世尔科技公司
生物安全柜	1384	赛默飞世尔科技公司
倒置荧光显微镜	IX73-DP80	日本奥林巴斯公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州净化设备公司

(3) 细胞和动物来源

人肝癌细胞(HepG2)和小鼠成纤维细胞(MEF)从中国科学基础研究所购买。实验所用小鼠为 BALB/c 雌性裸鼠(3 周),从南京大学(中国南京)模型动物研究所购买。

2.2.4 实验方法

2.2.4.1 材料合成及表征方法

(1) BSA@TCP 纳米粒子的合成

通过仿生矿化法合成 BSA@TCP^[86], 首先将 20mg BSA 溶解在 2mL DMEM 中密封, 并在 37°C 水浴下孵育 12h 使溶液达到过饱和的稳态结构。然后向反应体系中加入 20 μ L CaCl₂ (4M) 提供钙离子。再孵育 2h, 在高过饱和度(富钙环境)下, 牛血清蛋白中的酸性残基通过静电作用与游离的钙离子结合实现原位矿化。完成孵育后将反应液在 12000rpm 下离心 15min, 用水洗涤两次后得到 BSA@TCP。这些纳米颗粒重新分散于无水乙醇中进行进一步修饰。

(2) CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米粒子的合成

对得到的 BSA@TCP 纳米粒子进行进一步合成, 首先将分散在 20mL 无水乙

醇中的 20mg CAP 和分散在 20mL 无水乙醇中的 20mg BSA@TCP 混合在一起并在水浴中超声处理 10min 使其均匀分散, 然后加入 0.1g 六水合硝酸锌后用保鲜膜密封。在 37°C, 120rpm 下搅拌 1 小时固定 Zn 离子, 然后加入 2g 2-甲基咪唑继续搅拌反应 24h, 最后在 12000rpm 下离心 15min, 用乙醇洗涤两次冷冻干燥得到 CAP/BSA@TCP-ZIF-8。

(3) CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米粒子的表征

通过日立 S-4800 扫描电子显微镜日立 HT7800 透射电子显微镜观察分散在水中的 BSA@TCP、CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的形态特征。使用赛默飞 TF-G20 高分辨率透射电镜确定 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的元素分布。通过紫外可见分光光度计分别记录 1mg/L 的 TCP、BSA、BSA@TCP、ZIF-8 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的紫外可见光谱。用傅里叶红外光谱仪分别记录 TCP、BSA、BSA@TCP、ZIF-8 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的红外光谱。Zetasizer (Zetasizer Nano-ZS, 马尔文) 和动态光散射仪(DLS)分析 Zeta 电位和颗粒大小。

2.2.4.2 体外活性实验方法

(1) CAP/BSA@TCP-ZIF-8 中 CAP 的载药率

通过紫外-可见分光光度计法测定辣椒素在 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料的载药率和体外释放。首先, 制备一系列不同浓度的 CAP 乙醇溶液。通过线性拟合 CAP 浓度与 280nm 处吸收强度的函数关系, 得到 CAP 的标准曲线。然后, 将 1mg CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米粒分散到 5mL, pH5.0 的 PBS 中, 充分搅拌溶解后, 测量其在 280 nm 处的吸收强度, 重复测量三次。最后, 通过插入标准曲线计算出 CAP 的载药率。

(2) CAP/BSA@TCP-ZIF-8 中 CAP 的释放率

在将 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 溶于 pH 分别为 5.5、6.5 和 7.4 的 PBS 缓冲液中, 在 37°C, 120rpm 下, 用分子量 2000 的透析袋在超纯水中进行透析。孵育不同的时间后, 取透析液用 UV-Vis 分光光度计测量在 280nm 处的吸光强度, 重复测量三次, 通过插入标准曲线测出 CAP 的释放。

(3) CAP/BSA@TCP-ZIF-8 中 Ca^{2+} 的释放

通过钙离子分析试剂盒检测 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料体外钙离子的释放。将相同质量的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 分别溶于相同体积的 pH 为 5.5、6.5 和 7.4 的 PBS 缓冲液中。反应不同时间后, 将溶液在 10000rpm、10min、4°C 下

离心，去掉未降解的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 NPs。收集相同体积的上清液，用钙离子分析试剂盒检测钙离子的浓度，通过公式换算得到不同条件下钙离子的浓度。

(4) 细胞培养

人肝癌细胞（HepG2）和正常小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）系在含有 10% 胎牛血清、100IU/mL 青霉素和 100mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中培养，在提供 5%CO₂ 的 37℃ 培养箱中孵育。细胞在 25mm³ 培养瓶中培养，待细胞密度长至 80% 左右，将细胞消化并接种到平板或孔中进行进一步分析。

(5) 体外细胞毒性测定

用 CCK-8 试剂盒测定不同材料对 HepG2 的体外杀伤作用。细胞消化后，以每孔 4000 个的密度接种到 96 孔板中（100μL/孔）。孵育 24 小时后，加入不同浓度的材料，继续孵育 12 小时。然后用 200μL PBS 洗涤三遍并更换新鲜培养液，接下来在每孔中加入 10μL CCK-8 溶液，37℃、5%CO₂ 培养孵育 1 小时后，用酶标仪读取每个孔在 450nm 处的吸光值（OD）。按以下公式计算细胞相对存活率：

$$Cell\ vitality = \frac{OD_{samples} - OD_{blank}}{OD_0 - OD_{blank}} \times 100\%$$

OD_{samples}: 具有培养基、细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光值。

OD_{blank}: 具有培养基、CCK-8 溶液、药物溶液，没有细胞的孔的吸光值。

OD₀: 具有培养基、培养基、CCK-8 溶液，没有药物溶液的孔的吸光值。

(6) 细胞内钙含量测定

以 HepG2 细胞为细胞模型，使用钙离子荧光探针（Fluo-4,AM）检测细胞内 Ca²⁺ 浓度。使用 TRPV1 抑制剂 capsazepine（CPZ）^[87, 88] 验证 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 激活 TRPV1 离子通道的能力。HepG2 接种在 6 孔板中，在 37℃、5%CO₂ 培养箱下孵育 24 小时后，用含有 TCP、CAP、BSA@TCP、CAP/BSA@TCP-ZIF-8、CAP/BSA@TCP-ZIF-8+CPZ 的培养液更换培养基，继续共同孵育 12 小时。对于待检测的细胞，去除培养液，用 PBS 洗涤三遍。将 Fluo-4,AM（2μM）加入六孔板中覆盖细胞，37℃、5%CO₂ 培养 60 分钟后用 PBS 充分洗涤去除 Fluo-4,AM 工作液然后加入 PBS 缓冲液覆盖细胞 37℃、5%CO₂ 培养箱孵育 30 分钟。分别用流式细胞仪和倒置荧光显微镜检测细胞内钙离子浓度。

(7) 活死细胞染色

将 HepG2 细胞接种在六孔板中, 在 37°C、5%CO₂ 的培养箱中孵育 24 小时。贴壁后加入含 TCP、CAP、BSA@TCP、CAP/BSA@TCP-ZIF-8 有不同的纳米材料共同孵育 12 小时, 去掉培养基用 PBS 洗涤三遍, 然后加入 2 mL 钙黄素 AM(终浓度: 2 μM)和 PI(终浓度: 8 μM)的混合液。37°C 孵育 30 分钟后, 去除工作液, 用 PBS 洗涤三遍, 最后用倒置荧光显微镜观察细胞在不同条件下的荧光强度。

(8) 细胞内线粒体损伤研究

以 JC-1 为探针, 倒置荧光显微镜检测线粒体的损伤。将 HepG2 接种到六孔板中孵育 24 小时后, 加入含有 TCP、CAP、BSA@TCP、CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的培养液更换培养基。共同孵育 12 小时后, 用 PBS 洗涤 3 次, 然后每孔中加入 1 mL 配置好的 JC-1 工作液, 37°C, 5%CO₂ 培养箱孵育 15 分钟。去除多余的染料, 用染色缓冲液洗涤两次后放置到倒置荧光显微镜下, 观察线粒体的荧光强度。

2.2.4.3 体内活性实验方法

(1) 肿瘤模型

在本实验中, 通过对雌性裸鼠进行标准的皮下移植建立了 HepG2 荷瘤小鼠模型。将 1×10⁷ HepG2 肿瘤细胞(100 μL)注射到裸鼠皮下。大约一周后, 对肿瘤体积为 200 mm³ 的小鼠进行筛选, 随机分为 4 组以进行后续实验。

(2) 体内荧光成像

将 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 用 cy5 荧光探针标记, 重悬于 PBS 后经尾静脉注射, 注射后 0 h、1 h、2 h、4 h、12 h、24 h 后用 IVIS 50 (Excitation:640) 记录体内荧光强度图像。48 h 后脊椎脱臼处死裸鼠, 取心、肝、脾、肺、肾和肿瘤记录荧光强度图像, 并对图像进行定量分析。

(3) 体内抗肿瘤治疗

将荷瘤小鼠随机分为 4 组每组 5 只小鼠, 不同组小鼠经尾静脉分别注射 PBS 缓冲液、游离 CAP、BSA@TCP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8, 每 2 天一次。每天记录所有小鼠的肿瘤长(L)、宽(W)和体重。使用以下公式计算肿瘤体积 (V):

$$V = \frac{L \times W^2}{2}$$

(4) 肿瘤内 Ca²⁺含量

取相同质量的 PBS 缓冲液、游离 CAP、BSA@TCP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 治疗后的肿瘤组织, 将肿瘤组织剪切成细小的碎片。按照每 20mg 组织加入 200μL

的比例加入样品裂解液,用研磨仪匀浆,直至充分裂解。组织充分裂解后,在 4℃, 12000rpm 离心机离心 5min, 取上清液, 冰上放置待测。通过钙含量试剂盒测得肿瘤内的 Ca^{2+} 含量。

(5) 体内生物安全性

体内溶血实验,取新鲜哺乳动物血液 5mL,加入 0.2mL 乙二胺四乙酸(EDTA)后,室温用 PBS 洗涤, 1000 r/min 离心去除浑浊的上清液,直到上清液出现澄清为止。去掉上清液,取下层红色液体,用 PBS 缓冲液定容到 50mL 得到 2%红细胞溶液。将 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 用 PBS 配置为 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ 。取 1 mL 样品与 1 mL 的 2%红细胞液混合均匀, 37℃水浴 6 h 后 2000 r/min 离心 5 分钟。然后取 100 μL 上清液于 96 孔板中,用紫外分光光度计检测波长在 570 nm 处的 OD 值,阳性对照为加水组,阴性对照为加 PBS 组,每个样品两个平行。溶血率公式为:

$$\text{溶血率}\% = \frac{OD_{\text{样}} - OD_{\text{阴}}}{OD_{\text{阳}} - OD_{\text{阴}}} \times 100\%$$

其中 $OD_{\text{样}}$ 是样品组上清液 OD_{570} 的吸光值, $OD_{\text{阴}}$ 是 PBS 组上清液 OD_{570} 的吸光值, $OD_{\text{阳}}$ 是加水组上清液 OD_{570} 的吸光值。

小鼠经药物治疗两周后,处死小鼠,取心、肝、脾、肺、肾、肿瘤等脏器。将这些器官和肿瘤用多聚甲醛固定 (4℃, 48 h),然后将它们包埋在石蜡中进行 H&E 染色,不同组肿瘤进行 TUNEL 染色,然后通过倒置显微镜观察各个组织的细胞形态。通过眼球采血 2 mL,静止 1 小时后离心机在 1300 r/min, 15 min 取上清血清,取不同组小鼠血清约 400 μL ,检测血样中 ALT、AST、BUN、CR、TNF 等指标,检测该材料在体内的生物安全性。

2.3 结果与讨论

2.3.1 表征

CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒是通过多步方法制备的。我们通过仿生矿化反应利用 BSA 中带负电荷的酸性残基提供成核位点^[89],通过静电作用与无机 Ca^{2+} 结合形成 BSA@TCP 纳米颗粒。然后通过一锅法将 ZIF-8 包覆 BSA@TCP 并装载药物 CAP 合成 CAP/BSA@TCP-ZIF-8,材料制备工艺与杀伤机制如图 2-1

所示。

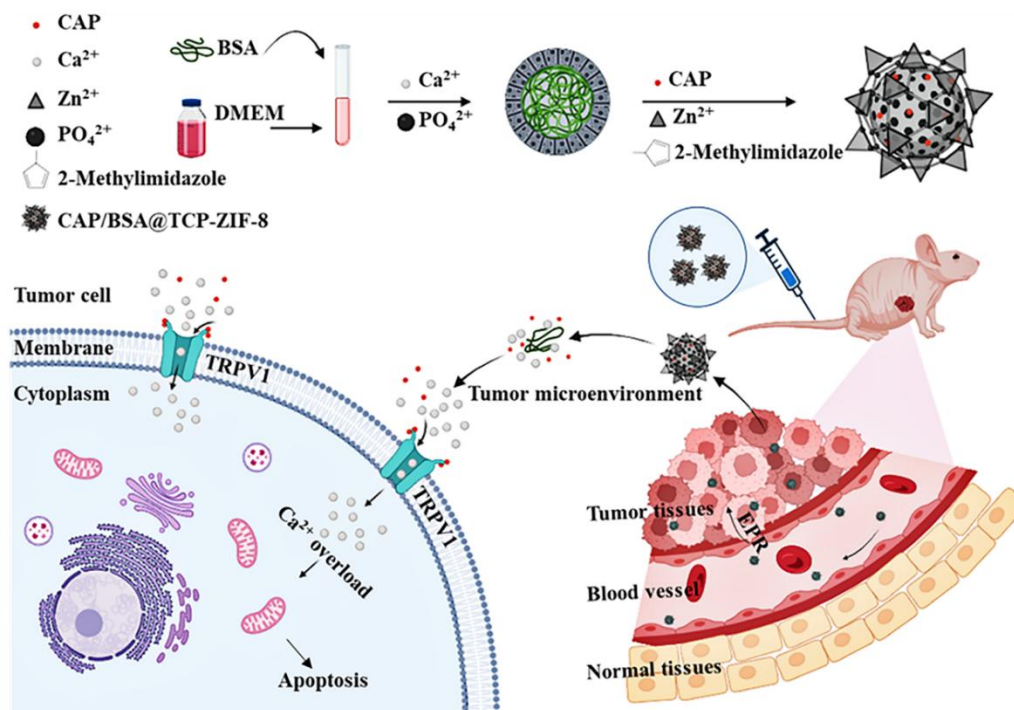


图 2-1.CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米粒子制备工艺、杀伤机制和肿瘤治疗示意图

Figure 2-1. Illustrative depiction of the preparation procedure, mode of operation, and potential for tumor therapy using CAP/BSA@TCP-ZIF-8 nanoparticles

SEM 结果（图 2-2A）显示，单独的 BSA@TCP 是分散性良好的球形纳米颗粒的尺寸约为 160nm，经 ZIF-8 包裹后 BSA@TCP-ZIF-8 表现出六菱形的结构，进一步装载 CAP 后，发现合成的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 直径增大到 270nm 左右（图 2-2B）。TEM 结果（图 2-2C）显示，六菱形框架中有明显的圆形结构，证明了 BSA@TCP 成功被 ZIF-8 包覆。

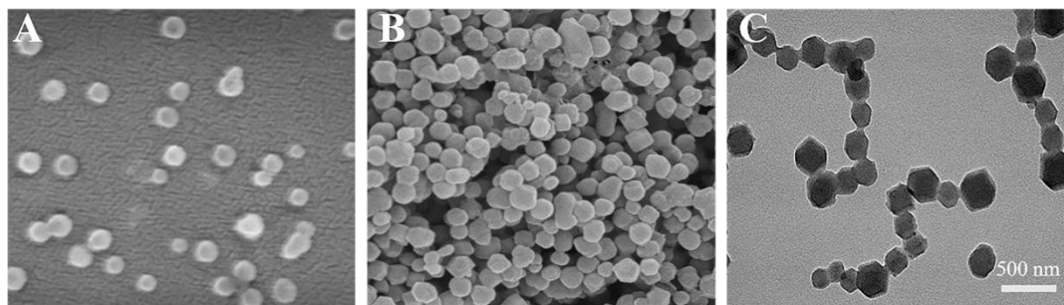


图 2-2. (A) BSA@TCP 的 SEM 图像 (B) CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的 SEM 图 (C)

CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的 TEM 图

Figure 2-2. (A) SEM images of BSA@TCP (B) SEM images of CAP/BSA@TCP-ZIF-8 (C) TEM

images of CAP/BSA@TCP-ZIF-8

动态光散射数据（图 2-3A）显示了类似的结果，BSA@TCP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的水动力尺寸分布为 167nm 和 277nm，进一步表明了 BSA@TCP 成功被 ZIF-8 包覆。图 2-3B 显示了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在 PBS 缓冲溶液和添加 10%FBS 的 DMEM 介质中的水动力尺寸，显示了纳米材料在这两种环境下的稳定性。

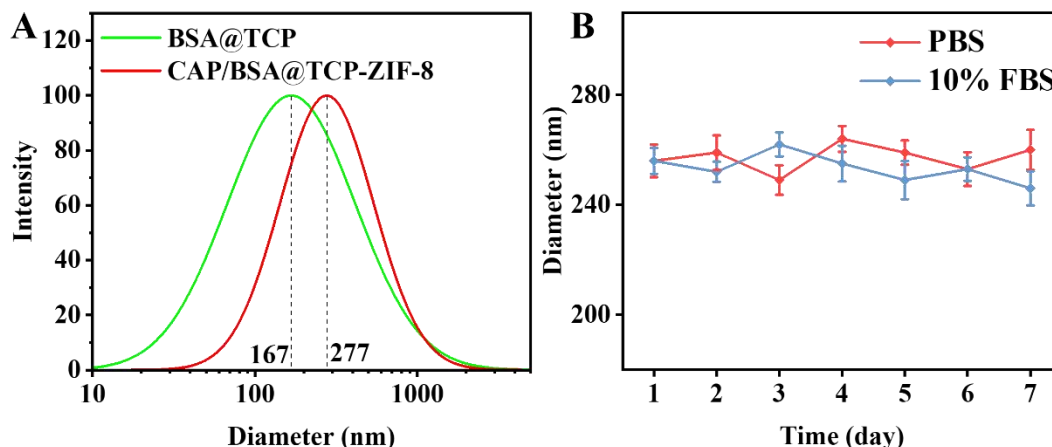


图 2-3. (A) BSA@TCP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的粒径分析图 (B)

CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在 PBS 缓冲溶液和添加 10%FBS 的 DMEM 介质中的水动力尺寸

Figure 2-3. (A) Particle size analysis of BSA@TCP and CAP/BSA@TCP-ZIF-8 nanoparticles (B) Hydrodynamic dimensions of CAP/BSA@TCP-ZIF-8 nanoparticles in PBS buffer solutions and DMEM media supplemented with 10%FBS

而且 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的元素图谱（图 2-4）也证实了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的成功合成，可以观察到 Ca、P 和 Zn 元素在纳米颗粒上的均匀分布，其中 Ca 和 P 来源于磷酸钙，Zn 来源于 ZIF-8。

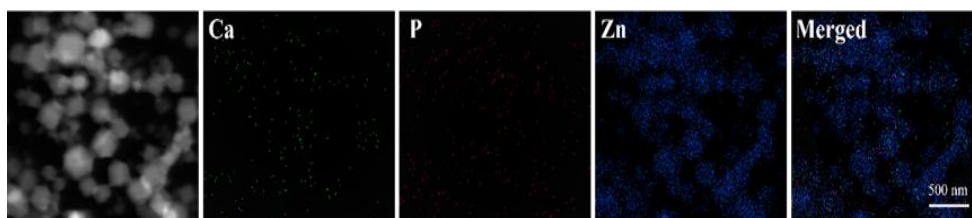


图 2-4. CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒中 Ca、P 和 Zn 的 Mapping 图谱

Figure 2-4. Mapping of Ca, P and Zn in CAP/BSA@TCP-ZIF-8 nanoparticles

BSA、TCP、ZIF-8、CAP、BSA@TCP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的傅里叶红外光谱如图 2-5A 所示。从 BSA 和 BSA@TCP 的光谱中可以看出，在 2900cm^{-1} 和 1635cm^{-1} 附近出现两个特殊吸收峰， 2900cm^{-1} 处的特征吸收是 C-H 基团的振动造成的， 1635cm^{-1} 的特征吸收归因于 C=O 基团的振动。而在 TCP 光谱中，在 2900cm^{-1} 和 1635cm^{-1} 附近没有观察到明显的吸收峰。从 TCP 光谱和 BSA@TCP 光谱可以看出在 1137cm^{-1} 处有明显特殊吸收峰， 1137cm^{-1} 处的特征吸收是 P-O 基团的振动造成的。这证明了磷酸钙能很好的包覆牛血清蛋白。从 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的光谱可以看出，在 1467cm^{-1} 附近出现的峰对应于 CAP 光谱中芳香环对应的特征峰。在 1590cm^{-1} 附近出现的峰对应于 ZIF-8 光谱中咪唑上 C=N 基团的伸缩振动，这些结果表明了 BSA@TCP 表面包覆了 ZIF-8 同时 CAP 能够很好的嵌入纳米颗粒内部。通过对比 CAP、BSA@TCP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 紫外-可见光谱（图 2-5B），可以发现 CAP 在 235nm 和 280nm 处的特征峰由于和 BSA@TCP 的结合出现了明显的偏移，进一步表明药物被成功包载。如图 2-5C 所示，BSA、BSA@TCP、CAP、CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的 Zeta 电位分别是 -6.9mV、-17.6mV、+11.3mV 和 -6.8mV。电位的变化证明了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的成功合成。通过查找相关文献发现 TCP^[79]和 ZIF-8^[90]纳米颗粒在酸性条件下可以解离，于是研究了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的 pH 响应解离是否会引起钙离子和 CAP 的 pH 依赖性释放，并进行了药物释放实验。

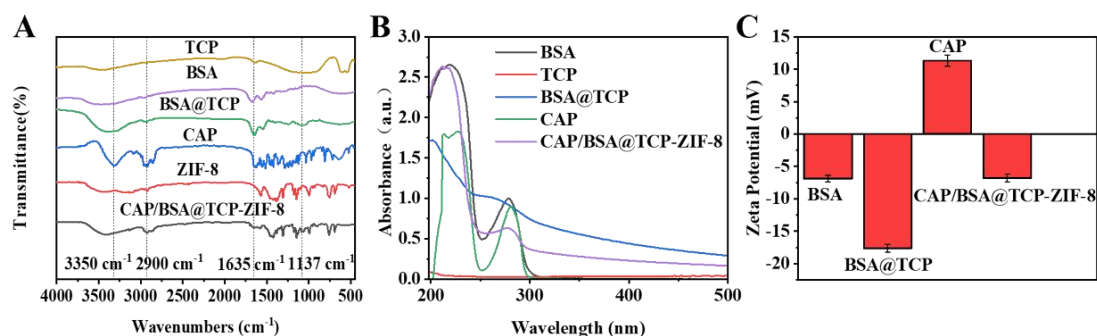


图 2-5. (A) TCP, BSA, BSA@TCP, CAP, ZIF-8 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的傅里叶红外光谱图 (B) TCP, BSA, BSA@TCP, CAP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的紫外可见光谱图 (C)

BSA, BSA@TCP, CAP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 的 Zeta 电位图

Figure 2-5. (A) FTIR spectra of TCP, BSA, BSA@TCP, CAP, ZIF-8 and CAP/BSA@TCP-ZIF-8

(B) UV-vis spectra of TCP, BSA, BSA@TCP, CAP, ZIF-8 and CAP/BSA@TCP-ZIF-8 (C) Zeta

potentials of BSA, BSA@TCP, CAP and CAP/BSA@TCP-ZIF-8

2.3.2 体外材料活性实验

(1) CAP/BSA@TCP-ZIF-8 中 CAP 的载药率和释放效率

如图 2-6 所示, 将 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒加入不同 pH 值的缓冲溶液中, 观察辣椒素的释放情况。将融入不同 pH 缓冲液的纳米颗粒装入透析袋中, 通过紫外-可见光谱测定不同时间点上透析液中 CAP 的含量, 得到不同 pH 下 CAP 随时间的释放曲线。曲线显示, 在 pH 为 7.4 时, CAP 在透析液的含量几乎为零, 而在 pH 为 6.5 和 5.5 时, 根据紫外-可见光谱测的吸光度值进行浓度换算可知, pH 值越低, 透析液中 CAP 的含量越高。由此可知, CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在 pH 为 7.4 时保持稳定, 在 pH 为 6.5 和 5.5 时发生分解, 且随着 pH 的降低, CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的解离率越高。

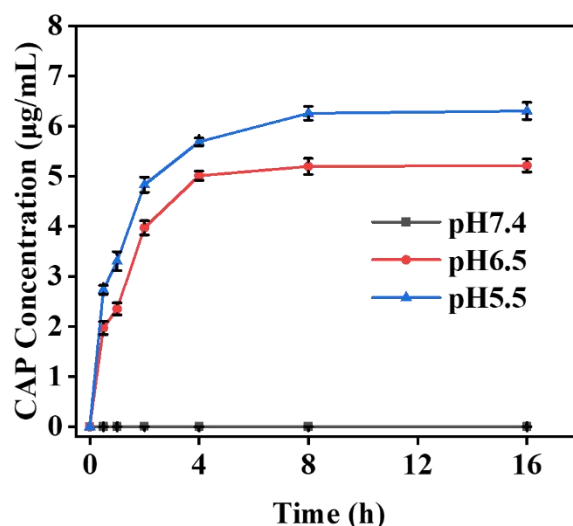


图 2-6. CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在不同 pH 下辣椒素随时间的释放曲线

Figure 2-6. Capsaicin release curve with time of CAP/BSA@TCP-ZIF-8 nanoparticles at different pH

同时如图 2-7 所示, 配置 20µg/mL、40µg/mL、60µg/mL、80µg/mL、100µg/mL 和 120µg/mL 浓度的 CAP 乙醇溶液, 测得的紫外可见光谱图如图 2-7A 所示。通过线性拟合不同 CAP 浓度与 280nm 处吸收强度的函数关系, 得到 CAP 的标准曲线如图 2-7B, 得到 CAP 浓度公式为:

$$y = 0.0105x - 0.0097$$

其中 y 为 CAP 在 280nm 吸收峰的 OD 值, x 为 CAP 的浓度。

用 pH 为 5 的 PBS 缓冲液将 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 稀释为四种不同浓度的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 溶液，使 CAP 能够充分释放到溶液中。通过紫外光谱仪测得 CAP 在 280nm 处吸收峰的 OD 值，插入标准曲线并计算出最终 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒中 CAP 的载药效率（DLE）为 $9.79 \pm 1.87\%$ 。

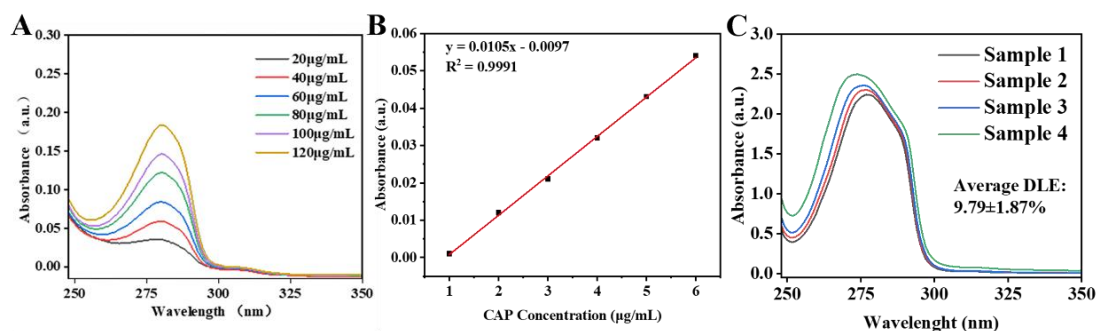


图 2-7. (A) 20µg/mL, 40µg/mL, 60µg/mL, 80µg/mL, 100µg/mL 和 120µg/mL 的 CAP 溶液的紫外光谱图 (B) CAP 在 280nm 处吸收峰的标准曲线 (C) 不同浓度的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 溶液的紫外光谱图

Figure 2-7. (A) UV-vis spectra of CAP solutions at 20µg/mL, 40µg/mL, 60µg/mL, 80µg/mL, 100µg/mL, and 120µg/mL (B) Standard curve of CAP absorption peak at 280nm (C) UV-vis spectra of CAP/BSA@TCP-ZIF-8 solutions at different concentrations

(2) CAP/BSA@TCP-ZIF-8 中 Ca^{2+} 的释放效率

采用钙浓度试剂盒测定不同 pH 的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 透析液中的 Ca^{2+} ，当 pH 为 7.4 时，随着时间的增加透析液中的 Ca^{2+} 含量保持稳定，而在 pH 为 6.5 和 5.5 时，随着时间的增加透析液中的 Ca^{2+} 浓度显著增加，相比较于 pH 为 6.5 当 pH 为 5.5 时，透析液中 Ca^{2+} 的浓度显著增加。结果表明 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒对 pH 响应性解离，同时在弱酸环境下能够有效释放 Ca^{2+} 。

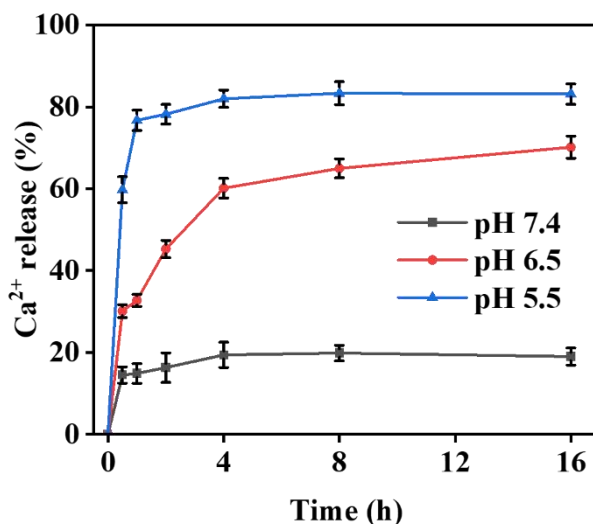


图 2-8. CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在不同 pH 下钙离子随时间的释放曲线

Figure 2-8. Release curves of calcium ions of CAP/BSA@TCP-ZIF-8 nanoparticles at different pH values over time

(3) 体外细胞毒性分析

根据文献报道, HepG2 细胞膜中含有 TRPV1 通道, 它是参与钙离子内流的通道之一^[40]。利用 HepG2 细胞建立实验模型, 研究 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的细胞毒性。采用 CCK-8 法体外评价 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的细胞毒性, 将 HepG2 细胞与不同材料共孵育 24 小时后检测细胞毒性。如图 2-9A 所示, 随着 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒浓度的增加, HepG2 细胞的细胞活性逐渐降低。当 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒浓度增加到 160 μ g/mL 时, 可致 80% 的细胞死亡。相反当加入瞬时受体电位香草素 1 型 (TRPV1) 的竞争拮抗剂 Capsazepine (CPZ) 时, HepG2 细胞的细胞活性随 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒浓度的增加而降低的趋势变小, 总体保持在 70% 以上。不同纳米颗粒处理的正常细胞实验如图 2-9B 所示, 将 MEF 细胞与不同纳米颗粒共孵育 24 小时后观察到 MEF 细胞的细胞活性不随 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒浓度的增加而显著降低, 总体活性保持 70% 以上。这些结果证明了相比较与正常细胞 MEF 癌细胞 HepG2 具有 TRPV1 通道, 辣椒素的存在会导致癌细胞死亡。同时检测 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒处理的 HepG2 在不同 pH 下的细胞活力(图 2-9C)。实验结果显示, 相比较于 pH 为 7.4 的环境, 在 pH 为 6.5 的环境下 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒对 HepG2 细胞活力的抑制能力更强, 这可能与

CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的酸反应降解能力有关。在酸性肿瘤微环境下，CAP/BSA@TCP-ZIF-8 降解释放 CAP 和钙离子。CAP 激活 TRPV1 通道有效破坏钙稳态，促进钙内流，而释放的钙离子进一步破坏钙稳态造成胞内 Ca^{2+} 超载，协同触发 Ca^{2+} 超载介导的细胞凋亡。细胞毒性实验也证明了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 对 HepG2 的抑制能力。

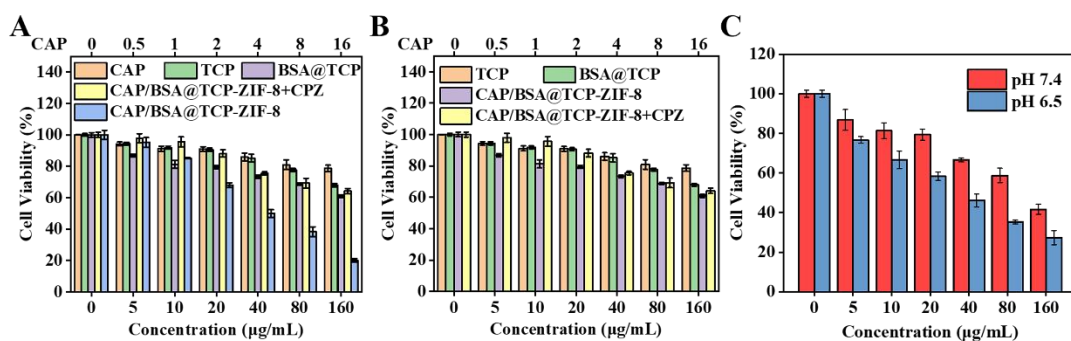


图 2-9. (A) CCK-8 法检测不同浓度 CAP, TCP, BSA@TCP, CAP/BSA@TCP-ZIF-8+CPZ 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 处理 HepG2 细胞后的细胞活力 (B) CCK-8 法检测不同浓度 TCP, BSA@TCP, CAP/BSA@TCP-ZIF-8 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8+CPZ 处理 MEF 细胞后的细胞活力 (C) CCK-8 法检测相同浓度 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 在不同 pH 下处理 HepG2 细胞后的细胞活力

Figure 2-9. (A) Cell viability of HepG2 cells treated with different concentrations of CAP, TCP, BSA@TCP, CAP/BSA@TCP-ZIF-8+CPZ and CAP/BSA@TCP-ZIF-8 as detected by CCK-8 assays (B) Cell viability of MEF cells treated with different concentrations of TCP, BSA@TCP, CAP/BSA@TCP-ZIF-8 and CAP/BSA@TCP-ZIF-8+CPZ as detected by CCK-8 assays (C) The cell viability of HepG2 cells treated with the same concentration of CAP/BSA@TCP-ZIF-8 at different pH was determined by CCK-8 assays

(4) 细胞活死染色分析

如图 2-10 所示，经过不同材料处理的 HepG2 细胞用 Calcein-AM/PI 荧光标记后通过倒置荧光显微镜观察，发现与单独的 CAP 组相比，CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒处理的 HepG2 细胞显示更多的红色荧光信号，表明大部分细胞死亡。而其他组细胞仍保持良好的细胞形态，呈现均匀分布的绿色荧光，表明细胞存活良好。以上实验结果可以证明，与单纯的 CAP 相比，CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒能够识别弱酸性的肿瘤微环境然后发生降解释放药物，同时其装载的钙离子能够放大 CAP 造成的 Ca^{2+} 超载促进肿瘤细胞凋亡。

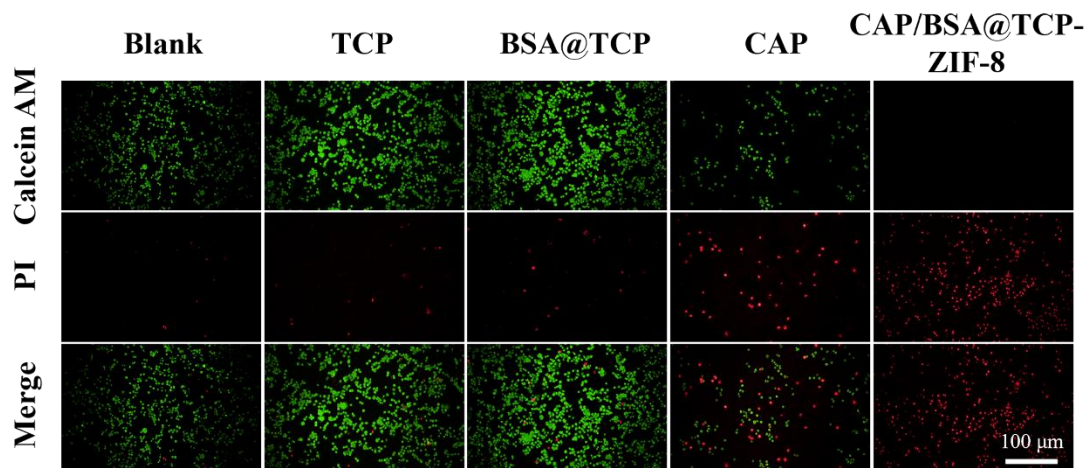


图 2-10.对照, TCP, BSA@TCP, CAP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 处理 HepG2 细胞后, 用 PI 和钙黄绿素 AM 染色后的荧光图

Figure 2-10. Fluorescence of HepG2 cells treated with PI and calcein AM staining as Blank, TCP, BSA@TCP, CAP and CAP/BSA@TCP-ZIF-8

(5) 细胞内 Ca^{2+} 含量分析

将 HepG2 细胞接种于六孔板, 孵育一定时间后, 采用 Fluo-4AM 荧光染料监测不同实验组的 Ca^{2+} 内流^[9]。倒置荧光显微镜不同材料组处理的 HepG2 细胞, 发现只有当 HepG2 细胞与 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒孵育时, 才能观察到强烈的绿色荧光信号 (图 2-11A)。与 CAP 纳米颗粒共孵育的 HepG2 细胞也能观察到明显的绿色荧光, 而与其他材料组共孵育的 HepG2 细胞在倒置显微镜下均未观察到明显的绿色荧光。

运用流式细胞术研究了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒与 HepG2 细胞共孵育不同时间后细胞内的 Ca^{2+} 浓度的变化。得到了不同实验组的细胞内 Ca^{2+} 含量。如图 2-11B 所示, 随着 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒与 HepG2 细胞共孵育时间越久, HepG2 细胞内 Ca^{2+} 浓度越高。用钙离子含量试剂盒测定不同材料组与 HepG2 细胞共孵育后胞内的 Ca^{2+} 浓度如图 2-11C 所示, CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒与 HepG2 细胞共孵育后, HepG2 细胞的 Ca^{2+} 摄取明显高于其他组, 几乎是对照组的 6 倍, 这有效证实了设计的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒可以特异性激活 TRPV1 通道, 增强 HepG2 细胞对 Ca^{2+} 的摄取, 提高胞内 Ca^{2+} 浓度。

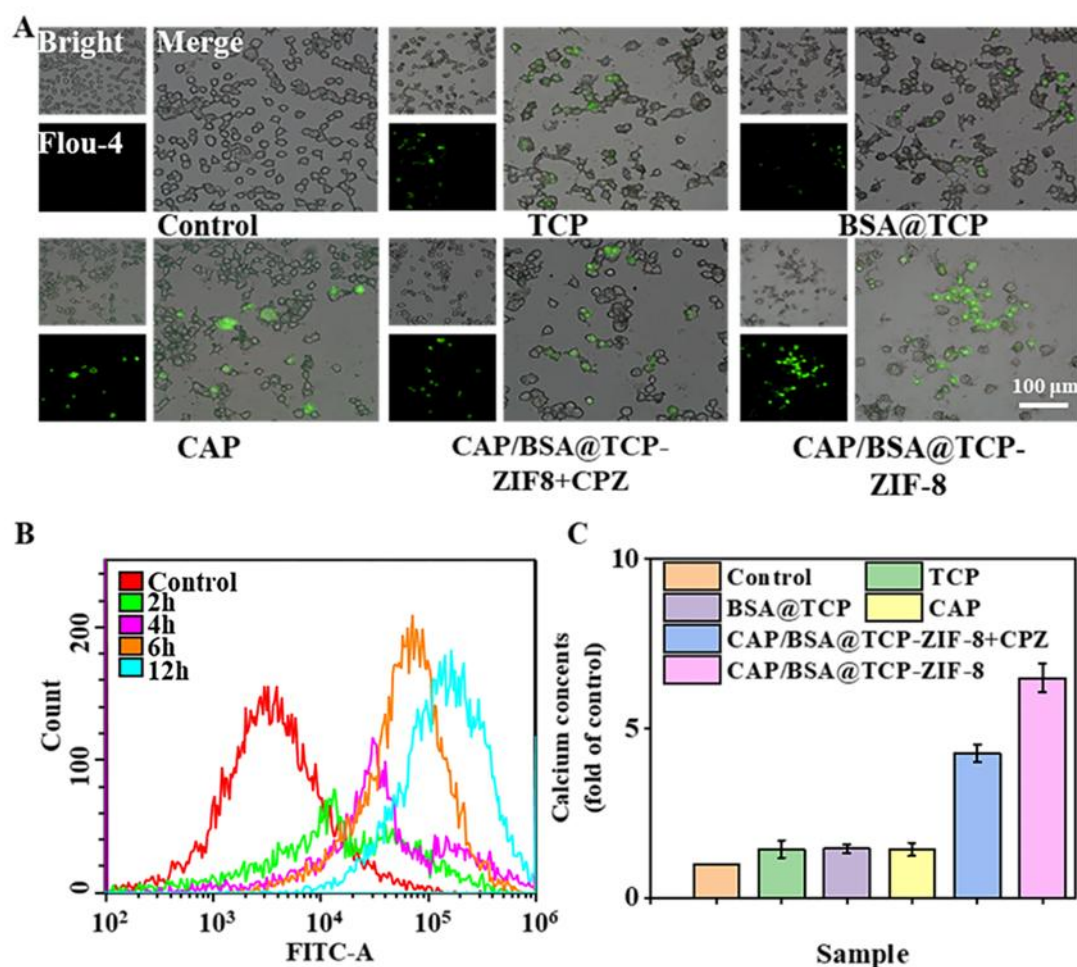


图 2-11. (A) 不同材料孵育的 HepG2 细胞经 Fluo-4 处理后的荧光图像，刻度：100 μm (B) 流式细胞术分析 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 处理 HepG2 细胞在不同时间点的 Ca^{2+} 摄取情况 (C)

不同处理组处理 HepG2 细胞后的胞内钙含量定量分析图

Figure 2-11. (A) Fluorescence images of HepG2 cells treated with Fluo-4 incubated with different materials, Scale bar: 100 μm (B) Ca^{2+} uptake in HepG2 cells treated with CAP/BSA@TCP-ZIF-8

at different time points was analyzed by flow cytometry (C) Intracellular calcium content of

HepG2 treated by different groups

(6) 体外细胞内线粒体膜电位检测

Ca^{2+} 对细胞的生理活动是必需的，但 Ca^{2+} 的过量流入也会破坏细胞内的平衡，造成线粒体膜去极化使线粒体损伤，最后导致细胞凋亡。在上述实验中，我们已经证明了我们设计的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒可以特异性激活 TRPV1 通道，促进胞外钙离子的过量流入，提高细胞内 Ca^{2+} 含量。随后我们通过线粒体膜电位检测试剂盒，以 JC-1 染料为探针，检测不同处理下细胞的线粒体损伤情况如图 2-12A 所示。JC-1 染色结果清楚的显示，相比较于其他实验组，经

CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒处理的细胞线粒体呈现明显的绿色荧光信号。而其他组多以橙色和红色为主，JC-1 有单体和多聚体两种存在状态，在损伤线粒体中以单体形式存在发出绿色荧光，在正常线粒体中以多聚体形式存在发出红色荧光。通过 ImageJ 对荧光进行定量，结果如图 2-12C 和 2-12B 所示，这一结果有效证实了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒处理的细胞发生严重的线粒体损伤。

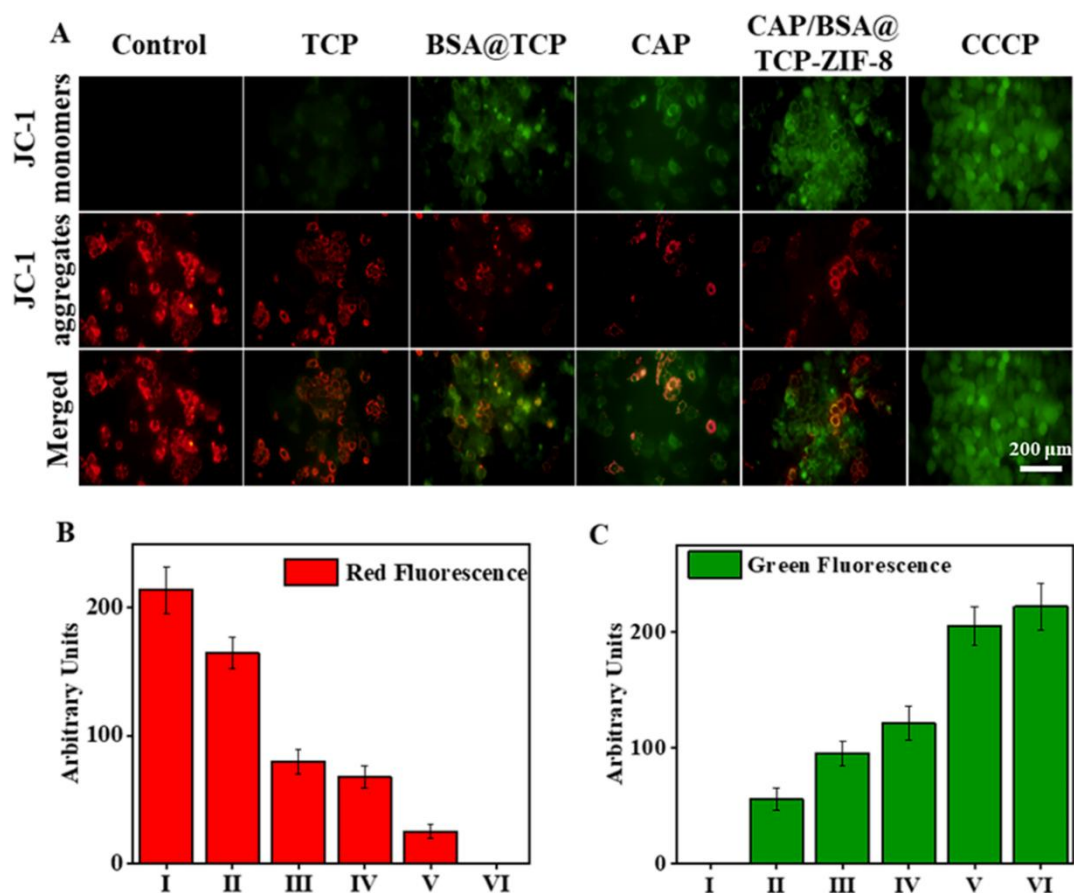


图 2-12. I: Control; II: TCP; III: BSA@TCP; IV: CAP; V: CAP/BSA@TCP-ZIF-8; VI: CCCP (A) 不同组处理 HepG2 细胞后的 JC-1 染色图，刻度：200 μ m (B) 通过 ImageJ 进行红色荧光定量 (C) 通过 ImageJ 进行绿色荧光定量

Figure 2-12. I: Control; II: TCP; III: BSA@TCP; IV: CAP; V: CAP/BSA@TCP-ZIF-8; VI: CCCP (A) JC-1 staining of HepG2 cells in different groups, Scale: 200 μ m (B) Red fluorescence quantification was performed by ImageJ (C) Green fluorescence quantification was performed by ImageJ

2.3.3 体内抗肿瘤活性实验

(1) 体内肿瘤靶向分析

检测 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在肿瘤体内聚集的可行性。将 cy 5 荧光探针标记的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 通过尾静脉分别注射于荷瘤裸鼠和空白裸鼠体内，并在指定时间点通过 IVIS 捕获荧光图像^[92]。如图 2-13A、2-13B 所示，注射前，小鼠体内几乎没有检测到荧光信号，注射一段时间后，肝脏、脾脏和肿瘤区均可见明显的荧光信号，说明 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒已经成功通过血液循环进入各个组织器官中。相比较于空白组，肿瘤组的肿瘤区域荧光信号强度随着时间延长而明显增强，而其他正常器官区域的荧光信号强度随着时间延长而不断减弱。这证明了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒经尾静脉注射入小鼠体内后通过 EPR 效应能够很好的靶向到肿瘤区域而减少在其他正常组织中的聚集。

注射 48h 后处死小鼠，采集心、肝、脾、肺、肾和肿瘤等主要脏器进行荧光成像，观察到 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒的在各个器官中的生物分布如图 2-13C 所示。相比较于其他脏器，肿瘤表现出强烈的荧光信号，其强度远远高于肾脏，表明了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒具有良好的肿瘤靶向能力。通过对各个器官进行荧光强度定量分析，结果如图 2-13D 所示与预期相符。

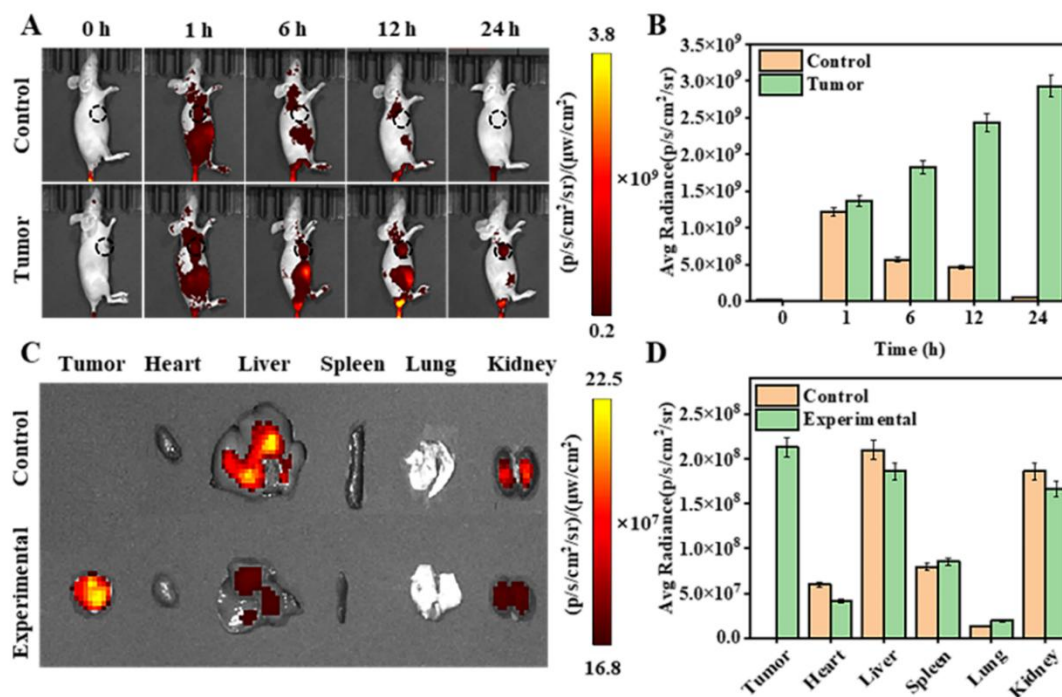


图 2-13. (A)注射 CAP/BSA@TCP-ZIF-8(160μg/mL)后不同时间点荷瘤小鼠的体内荧光图

像(B)小鼠体内荧光定量分析图(C) CAP/BSA@TCP-ZIF-8 注射后 48 h 后主要器官的荧光图
像(D)小鼠主要器官荧光定量分析图

Figure 2-13. (A) Fluorescent images of tumor-bearing mice injected with CAP/BSA@TCP-ZIF-8 (160 $\mu\text{g/mL}$) at different time points (B) Fluorescence quantification in mice (C) Fluorescence images of major organs 48 h after CAP/BSA@TCP-ZIF-8 injection (D) Quantitative fluorescence analysis of major organs in mice

(2) 体内抗肿瘤效果

为了进一步证实 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在体内抗肿瘤能力,对它进行了抗肿瘤的研究。以 HepG2 荷瘤裸鼠为动物模型, 将小鼠随机分为 4 组, 每两天给小鼠注射 PBS 缓冲液、TCP、游离 CAP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8。每天记录小鼠肿瘤的长度 (L)、宽度 (W) 和体重并拍照。图 2-14A、2-14B 为小鼠治疗两周后不同实验组肿瘤的前后体积变化图。在治疗开始前, 各组小鼠的平均肿瘤体积和形貌相似, 但随着喂养时间的延长, PBS 缓冲液组、TCP 组和游离 CAP 组的肿瘤的体积仍然快速增长, 与之形成鲜明对比的是 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 治疗的小鼠的肿瘤体积明显减小, 实验结果证明 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 能够显著抑制肿瘤生长。记录小鼠在治疗期间的体重 (图 2-14C)。正如预期的那样, 各个实验组的体重都无明显波动, 表明不同材料对小鼠体内的副作用很小。

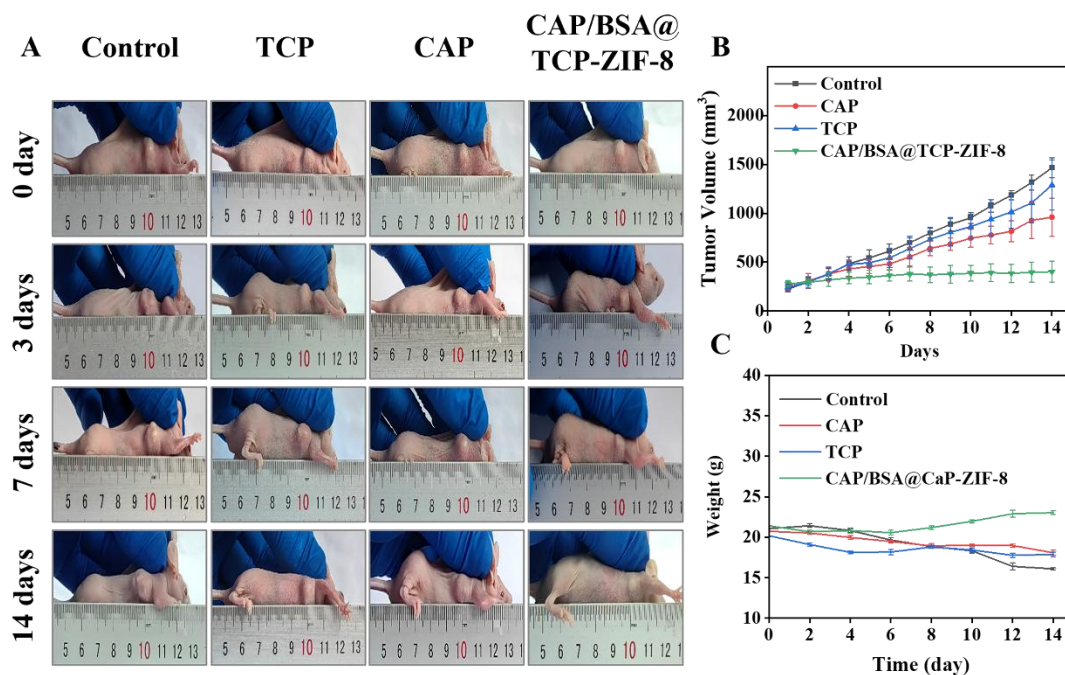


图 2-14. (A) 用 PBS 缓冲液、TCP、游离 CAP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 处理 14 天后小鼠的肿瘤变化 (B) 在 14 天的治疗期间, 小鼠肿瘤体积的变化 (C) 小鼠在治疗期间的体重变化

Figure 2-14. (A) Tumor changes in mice after 14 days of treatment with PBS buffer, TCP, free CAP, and CAP/BSA@TCP-ZIF-8 (B) During 14 days of treatment, the tumor volume of the mice changed (C) Weight changes in mice during treatment

(3) 体内肿瘤内 Ca^{2+} 含量分析

图 2-15 A、2-15 B 为治疗两周后不同实验组肿瘤质量比较, 结果与肿瘤体积变化图一致, CAP/BSA@TCP-ZIF-8 治疗的小鼠的肿瘤质量明显下降, 平均肿瘤质量仅为 0.15 g 左右, 进一步证明我们合成的纳米材料具有良好的抗肿瘤能力。

为了进一步研究我们合成的纳米材料 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 在体内是否造成钙离子内流使癌细胞内的钙浓度增加。如图 2-15 C 所示, 取相等质量的肿瘤组织碾磨后加入裂解液充分通过定量分析可以清楚的显示不同组间 Ca^{2+} 浓度的差异。与对照组相比, CAP/BSA@TCP-ZIF-8 组的钙离子浓度大约提高了 20 倍, 明显高于 TCP 组和 CAP 组, 表明 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒处理小鼠肿瘤能够明显提高胞内钙离子浓度造成细胞凋亡。

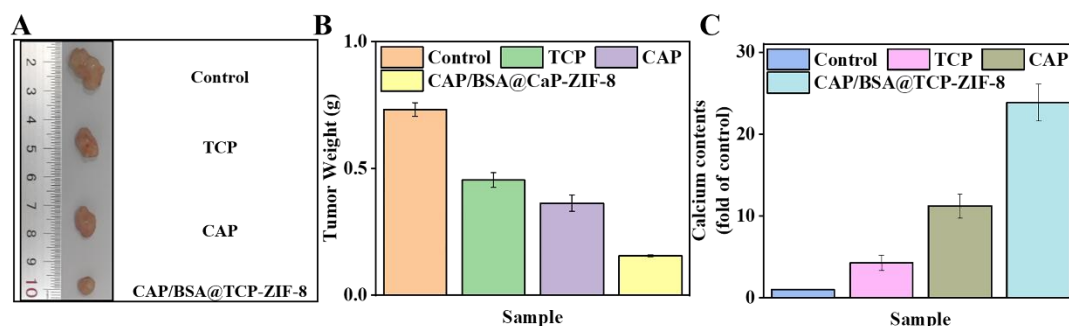


图 2-15. (A) Control, TCP, CAP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 治疗 14 天后的肿瘤照片 (B) Control, TCP, CAP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 治疗 14 天后的肿瘤质量 (C) Control, TCP, CAP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 治疗 14 天后的肿瘤内钙含量

Figure 2-15. (A) tumor photos after 14 days of Control, TCP, CAP and CAP/BSA@TCP-ZIF-8 treatment (B) tumor quality after 14 days of Control, TCP, CAP and CAP/BSA@TCP-ZIF-8 treatment (C) the content of calcium in tumor after Control, TCP, CAP and

CAP/BSA@TCP-ZIF-8 treatment for 14 days

为了进一步研究 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在体内对肿瘤的效果, 对

PBS 缓冲液、TCP、游离 CAP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 处理的裸鼠肿瘤进行 TUNEL 分析。如图 2-16 A 所示，与 PBS 缓冲液和 TCP 处理的小鼠肿瘤相比，用游离 CAP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 处理的小鼠肿瘤中凋亡细胞（红色荧光）明显增多，其中 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 组的肿瘤细胞凋亡率最高。通过 ImageJ 分析获得活细胞和死细胞的个数如图 2-16 B 和 2-16 C 所示，这些实验结果证明了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米粒子具有很强的抗肿瘤作用，并且这种治疗作用比单独的 CAP 治疗更强。

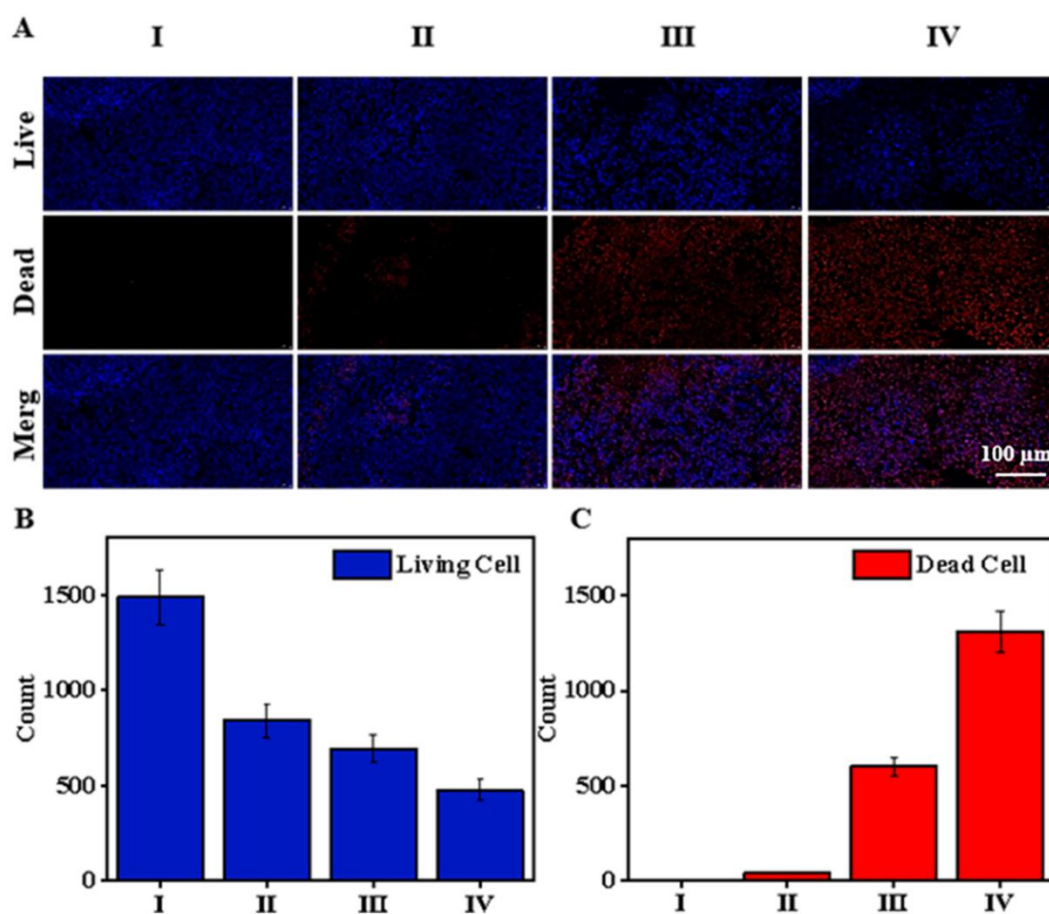


图 2-16. I: Control; II: TCP; III: CAP; IV: CAP/BSA@TCP-ZIF-8 (A) 不同处理条件下小鼠肿瘤组织的 TUNEL 染色, 标尺为 100 μm (B) 用 ImageJ 测量的活细胞数目 (C) 用 ImageJ 测量的死细胞数目

Figure 2-16. I: Control; II: TCP; III: CAP; IV: CAP/BSA@TCP-ZIF-8 (A) TUNEL staining of mouse tumor tissue under different treatments, The scale bar was 100 μm (B) The number of living cells measured by ImageJ (C) The number of dead cells measured by ImageJ

(4) 体内生物安全性评价

为了检测给药过程中潜在的生物毒性，通过溶血实验结果如图 2-17 所示，当 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料在血液中的浓度小于 300 $\mu\text{g/mL}$ 时不会发生溶血现象。这种结果表明，当 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料用于体内治疗时应将浓度控制在 300 $\mu\text{g/mL}$ 以内。

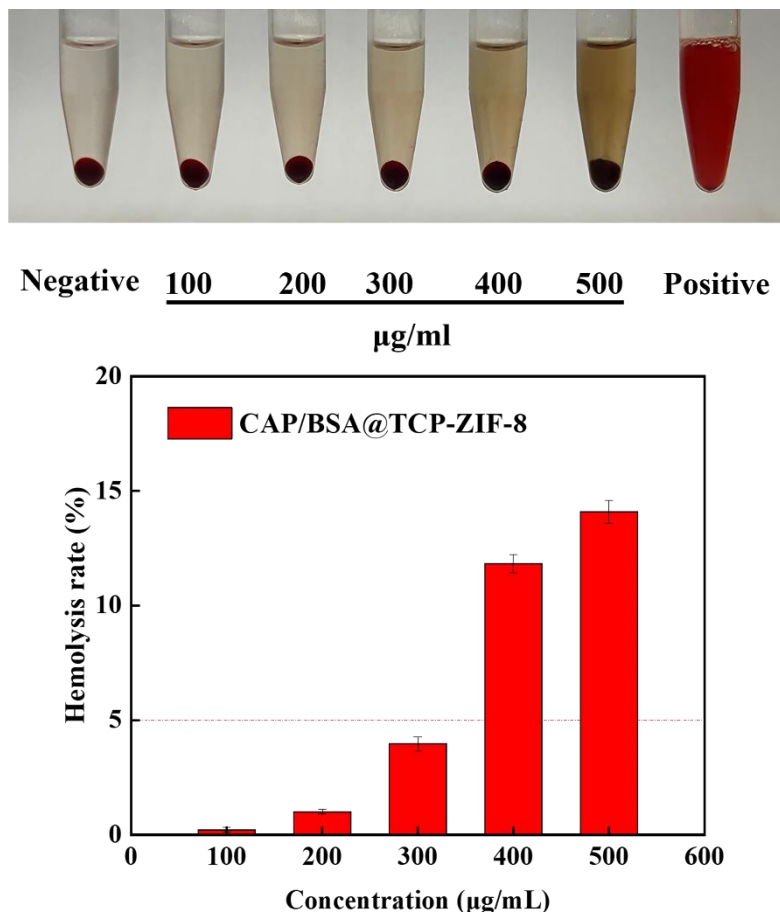


图 2-17.不同浓度的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料与血细胞孵育后的溶血率

Figure 2-17. Hemolysis rate of different concentrations of CAP/BSA@TCP-ZIF-8 nanomaterials incubated with blood cells

对不同组的血液样本进行了生化指标检测。如图 2-18 A-D 所示，对各组的血液样本的分析显示，与 PBS 对照组相比，CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料处理的小鼠相关功能指标没有出现较大的波动。测定的谷丙转氨酸（ALT）、谷草转氨酸（AST）、尿素氮（BUN）、肌酐（CREA）等指标均在正常范围内，说明 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料在治疗过程中未对小鼠的其他正常器官造成较大的损伤。

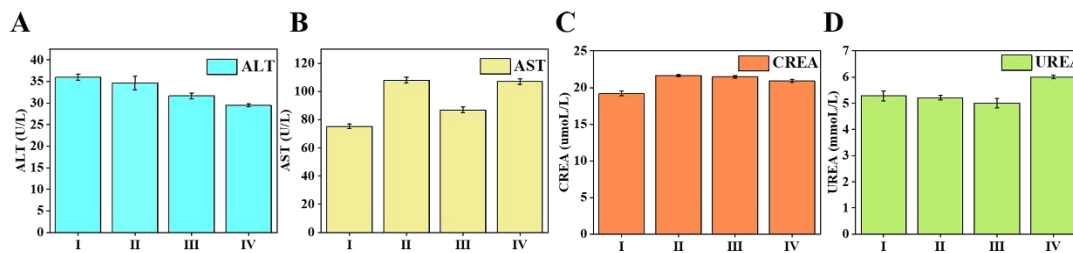


图 2-17. I: Control; II: TCP; III: CAP; IV: CAP/BSA@TCP-ZIF-8(A)~(D)测定不同实验组治疗后血清中 ALT、AST、CREA、UREA 的含量

Figure 2-17. I: Control; II: TCP; III: CAP; IV: CAP/BSA@TCP-ZIF-8 (A) ~ (D) Measurement of ALT, AST, CREA, and UREA levels in the blood samples from different groups

同时对各组小鼠治疗 14 后的主要器官和肿瘤切片进行 H&E 染色分析。如同 2-18 所示，经 CAP 和 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 处理的小鼠肿瘤细胞与 PBS 对照组和 TCP 组相比，肿瘤细胞大量死亡，而其他主要器官未受到明显损伤。这些体内治疗性结果表明，CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米材料将是有效抗癌的良好候选者，而且潜在的生物学副作用很小。

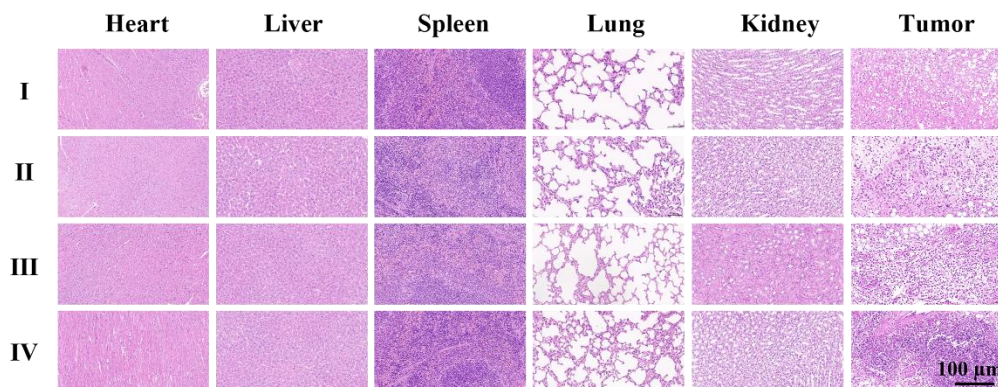


图 2-18. H&E 分析各治疗组裸鼠的主要器官和肿瘤组织

Figure 2-18. H&E analysis of the main organs and tumor tissues of nude mice in each treatment group

2.4 本章小结

综上所述，本研究受 CAP 激活钙离子通道诱导 Ca^{2+} 超载凋亡启发，设计并合成了具有更小毒副作用的新型 CAP 负载磷酸钙纳米颗粒，用于肿瘤微环境响应性药物释放和 TRPV1 激活的肿瘤特异性治疗。通过仿生矿化法将辣椒素、磷酸钙和牛血清蛋白结合形成稳定的纳米颗粒，最外层用 ZIF-8 包裹。由于肿瘤微

酸性环境的特点，CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在到达肿瘤部位后，会有效响应肿瘤微环境，快速降解并释放钙离子和 CAP。CAP 激活 HepG2 细胞膜上的 TRPV1 通道引起大量钙离子内流，造成胞内 Ca^{2+} 超载。释放的钙离子进一步放大 Ca^{2+} 超载，导致线粒体严重损伤，最终达到杀伤肿瘤的效果。

体外细胞实验表明，CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒能有效在肿瘤微环境下释放辣椒素激活细胞的 TRPV1，造成胞内 Ca^{2+} 超载从而杀死肿瘤。荧光成像显示，CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒能够快速造成细胞内的钙离子浓度升高，导致线粒体严重损伤，最终达到杀死肿瘤的效果。体内研究表明，CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒可以被动积累到肿瘤区域，同时并不影响其他正常细胞的代谢。CAP/BSA@TCP-ZIF-8 介导的 Ca^{2+} 超载治疗对 HepG2 肿瘤具有较高的肿瘤抑制率（71.65%）。通过仿生矿化法合成的 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒相比较于单独的 CAP 更具有良好的生物安全性。本文提出的治疗策略不需要外界刺激来触发，纳米材料具有良好的生物相容性，对正常细胞的代谢无明显影响。通过放大 Ca^{2+} 超载导致线粒体损伤从而杀死肿瘤细胞，在癌症治疗中具有很大的潜力。

第3章 ZIF-8 负载 CAP/NAADP 的体系的制备及其抗肿瘤研究

3.1 引言

Ca^{2+} 是一种普遍存在的第二信使,参与许多不同的细胞内信号传导过程。控制着细胞运动、膜融合、离子通道功能、酶活性和基因表达等多种细胞机制^[93]。细胞质游离钙水平由泵、交换器和包括细胞器储存在内的缓冲机制严格控制。当这些缓冲机制被外来刺激激活时,则会造成细胞内钙稳态的紊乱,从而导致细胞死亡^[94]。许多细胞表面受体与信号通路相连,这些信号通路通过激活特定的钙释放通道从细胞内储存细胞器中动员 Ca^{2+} 。

NAADP 是于 1987 年发现的,存在于无脊柱动物海胆卵和哺乳动物的肌肉、神经、腺体等组织细胞中^[95]。NAADP 介导钙信号传导的途径有两种:通过预先自激活 NAADP 受体或 NAADP 受体药物阻滞剂来抑制激动剂引起的钙信号。目前研究发现 NAADP 通过 1 型兰尼碱受体(RyR1)激活启动钙释放^[96]。NAADP 还调节肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR),内质网(endoplasmic reticulum, ER)和溶酶体等不同细胞器内储存的钙释放,造成胞内 Ca^{2+} 含量升高。而 CAP 能够特异性激活胞外 TRPV1 通道,从而使 Ca^{2+} 流入细胞,造成胞内钙含量增高。然而如何使两种药物结合从而更好的放大钙超载,考虑选用酸敏特性的 ZIF-8 作为药物载体。ZIF-8 的酸敏特性可以很好的靶向到肿瘤微环境从而将药物释放到肿瘤区域。FA 是机体中参与一碳单位转移的重要辅助因子,也是基因复制的必需物质。叶酸受体(folate receptor, FAR)是细胞有效摄入 FA 而特异性表达受体,对 FA 具有高亲和力^[97]。当 FA 与靶细胞上 FAR 特异性结合时,能通过受体介导的内吞作用被内化进入细胞,研究发现在一些肿瘤细胞表面会高表达 FAR 摄取更多的 FA^[98],这提示 FAR 可以作为潜在的靶点用于肿瘤靶向治疗。

基于此,本章构建了一种靶向肿瘤的钙超载治疗纳米材料 CAP/NAADP@ZIF-8-FA。通过 CAP 打开钙通道促进钙离子内流与 NAADP 调节

细胞内部的钙库释放 Ca^{2+} , 进一步放大肿瘤内部 Ca^{2+} 含量造成钙超载从而杀死细胞。

3.2 实验材料与方法

3.2.1 实验材料

(1) 实验试剂

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagent

实验试剂	生产厂家
辣椒素(CAP, $\geq 95\%$)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
2-甲基咪唑(2-methylimidazole, 99%)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
六水硝酸锌($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98%)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
叶酸 (FA, $\geq 97\%$)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
烟酸腺嘌呤二核苷酸磷酸钠盐 (NAADP, $\geq 92.5\%$)	上海麦克林生化科技股份有限公司
DMEM 培养基	武汉塞维尔生物科技股份有限公司
CCK-8 试剂盒	江苏凯基生物技术股份有限公司
细胞活死检测试剂盒	江苏凯基生物技术股份有限公司
线粒体膜电位测定试剂盒	上海泰坦科技股份有限公司
钙含量测定试剂盒	上海碧云天生物科技股份有限公司
Fluo-4 AM (钙离子荧光探针, 2mM)	上海碧云天生物科技股份有限公司

(2) 实验仪器

表 3-2 实验仪器

Table 3-2 Experimental equipment

实验仪器	型号	生产厂家
扫描电子显微镜	S-4800	日本日立公司
紫外可见分光光度计	UV-3600	日本岛津公司
傅里叶红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
Zeta 电位粒度仪	Nano Brook 90 PlusPALS	美国 Brook haven 公司
全波长酶标仪	INFINITE 200 PRO	美国 TECAN 公司
高速冷冻离心机	Z326k	德国赫姆勒公司
荧光显微镜	DM2500 LED	德国莱卡公司
流式细胞仪	CytoFLEX	贝克曼有限公司
CO ₂ 培养箱	4111	赛默飞世尔科技公司
生物安全柜	1384	赛默飞世尔科技公司
倒置荧光显微镜	IX73-DP80	日本奥林巴斯公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州净化设备有限公司

(3) 细胞来源

人肝癌细胞 (HepG2) 和小鼠成纤维细胞 (L929) 从中国科学基础研究所购买。

3.2.2 试验方法

3.2.2.1 材料合成及表征方法

(1) CAP/NAADP@ZIF-8 的合成

称取 2 mg CAP 和 0.1 mL 的 NAADP 溶液 (0.5 $\mu\text{g/mL}$) 放入烧杯中, 再称取 0.1 g $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入烧杯中。加入 20 mL 超纯水混合, 在 4 $^\circ\text{C}$, 避光下搅拌 2 h, 随后加入 1 g 2-甲基咪唑, 接着将溶液用封口膜封口避光搅拌 24 h。反应结束后收集溶液, 12000 rpm 下离心 15 min。离心完成后收集沉底, 用超纯水洗涤三遍后得到 CAP/NAADP@ZIF-8, 最后将其保存在 -20 $^\circ\text{C}$ 下备用。

(2) CAP/NAADP@ZIF-8-FA 的合成

将事先准备好的 1 g CAP/NAADP@ZIF-8 放入烧杯中, 称取 10 mg FA 加入, 倒入 20 mL 超纯水混合。避光搅拌 12 h 后收集溶液, 12000 rpm 下离心 20 min。离心完成后收集沉淀, 超纯水洗涤三遍后分散到超纯水中。将溶液冷冻干燥后得

到 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒。

(3) SEM 表征

将合成的 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒用超纯水稀释一定倍数直至溶液澄清。用胶头滴管取部分溶液滴至事先准备的干净硅片上, 随后将硅片避光后自然阴干。待硅片上的液滴完全干燥后用导电胶固定在样平台上, 通过扫描电子显微镜观察纳米材料的形貌并拍照记录。

(4) 粒径表征

首先, 用超纯水制备一定浓度的 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 溶液, 然后放到超破碎仪中超声 10 min。然后, 从溶液中取出 2 mL 液体并放入样品槽中。最后, 用 DLS 粒度仪对每个样品进行 3 次检测, 每次检测进行 12 个循环。

(5) Zeta 电位表征

分别取一定量的 CAP、NAADP、CAP/NAADP@ZIF-8、FA 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒溶于超纯水中, 然后放到超破碎仪中超声 10 min 后直到材料完全溶解后取出。随后取 2 mL 不同溶液分别放入样品槽中用 DLS 粒度仪对每个样品进行 3 次检测, 每次检测进行 12 个循环。

(6) FT-IR 表征

分别称取一定量的 CAP、NAADP、FA 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 放入研钵中加入适量的溴化钾, 用研杵研磨直至样品成细腻粉末。压片机压片后置于傅里叶红外光谱仪中, 在 $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ 处测定其红外光谱。

(7) UV-VIS 表征

称取一定量的 CAP、NAADP、FA 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 用超纯水配置成溶液。经超声破碎仪超声 10 min 后取 3 mL 左右放入比色皿, 用紫外可见分光光度计测定在 190-600 nm 范围内的紫外光谱。

3.2.2.2 体外材料活性实验

(1) CAP/NAADP@ZIF-8-FA 中 NAADP 的负载率

取一定量的 NAADP 用超纯水配置成 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的溶液。用紫外可见分光光度计分别测得不同浓度的溶液在 200-600 nm 范围内的吸收值, 并作出折线图。以超纯水为空白对照, 在 260 nm 处记录吸光度值, 绘制以吸光度为 Y 轴, 浓度为 X 轴的标准曲线, 得到回归方程。随后将 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 用 pH 为 5.5 的磷酸缓冲液配置成三个浓度

并使其充分裂解。在紫外可见分光光度计下测得样品在 260 nm 处的吸光度值，通过插入标准曲线计算出 NAADP 的载药率。

(2) CAP/NAADP@ZIF-8-FA 中 NAADP 的释放速率

将 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒分别用 pH 为 5.5、6.5 和 7.4 的磷酸缓冲液配置成相同浓度的溶液。将分子量为 2000 的透析袋提前用沸水蒸煮 5 分钟，然后将配好的溶液装进透析袋中，透析袋两端用封口夹夹住防止溶液流出，随后放入烧杯中并加入适量的 PBS 缓冲液没过透析袋。将烧杯固定在摇床上进行匀速摇晃。在不同的时间点取 1 mL 上清液用紫外可见分光光度计测得样品在 260 nm 处的吸光度值，并参考标准曲线计算出 NAADP 的释放曲线。

(3) 细胞毒性检测

人肝癌 (HepG2) 细胞培养于含 10 % FBS 和 1 % 青霉素/链霉素的 DMEM 中，小鼠成纤维 (L929) 细胞培养于含 10 % FBS 和 1 % 青霉素/链霉素的 DMEM 中。所有细胞均在 37°C、5 % CO₂ 条件下培养。

为了考察 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒在体外正常细胞中的生物安全性，将对数生长期的 L929 细胞经胰酶消化后接种于 96 孔板 (100 μ L/孔) 中，在 37°C、5 % CO₂ 条件下孵育 24 h。设置 FA、ZIF-8、NAADP 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 实验组，浓度依次为 5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL、80 μ g/mL、160 μ g/mL 和 320 μ g/mL，DMEM 培养基作为空白对照，每组 10 个平行。将材料与细胞共孵育 24 h 后，用移液枪去除培养基并用 PBS 缓冲液洗涤三次将杂质洗去，然后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液在 37°C、5 % CO₂ 条件下继续孵育约 2 h。随后取出立即用酶标仪记录 450 nm 处的吸光度，计算出细胞活力，实验重复三次。

采用 CCK-8 法检测 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒对癌细胞活力的影响。将对数生长期的 HepG2 细胞经胰酶消化后接种于 96 孔板 (100 μ L/孔) 中，在 37°C、5 % CO₂ 条件下孵育 24 h。设置 FA、ZIF-8、NAADP、CAP 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 实验组，浓度依次为 5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL、80 μ g/mL、160 μ g/mL 和 320 μ g/mL，DMEM 培养基作为空白对照，每组 10 个平行。将材料与细胞共孵育 24 h 后，用移液枪去除培养基并用 PBS 缓冲液洗涤三次将杂质洗去，然后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液在 37°C、5 % CO₂ 条件下继续孵育约 2 h。随后取出立即用酶标仪记录 450 nm 处的吸光度，计算出

细胞活力，实验重复三次。

(4) 细胞内钙含量检测

采用 Fluo-4, AM 钙离子荧光探针检测细胞内的钙含量，首先将对数生长期的 HepG2 细胞经胰酶消化后接种于 6 孔板（2 mL/孔）中，在 37°C、5 % CO₂ 条件下孵育 24 h。设置 FA、ZIF-8、NAADP、CAP 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 实验组，与细胞共孵育 24 h。配置 Fluo-4, AM 工作液，使用 PBS 缓冲液将 Fluo-4, AM 储液稀释到 2 μM 的终浓度。对于待检测的培养细胞，用移液枪吸去培养基，用 PBS 缓冲液洗涤三次。将 Fluo-4, AM 工作液加入六孔板中，加入量以覆盖细胞为准。在 37°C 培养 1 h，然后去除 Fluo-4, AM 工作液并用 PBS 缓冲液洗涤三次，充分去除残留的 Fluo-4, AM 工作液。然后加入 1 mL 的 PBS 缓冲液至六孔板中，在 37°C、5 % CO₂ 培养箱孵育约 30 min，以确保 AM 基团在细胞内的完全去酯化作用。随后用倒置显微镜观察细胞内的钙荧光情况。随后将细胞收集，加入适量的细胞裂解液，使细胞完全裂解。离心取上清液用钙离子检测试剂盒测量胞内钙含量。

(5) 活死荧光染色实验

将 HepG2 细胞接种在六孔板中，在 37°C、5%CO₂ 的培养箱中孵育 24 小时。贴壁后加入含 TCP、CAP、BSA@TCP、CAP/BSA@TCP-ZIF-8 有不同的纳米材料共同孵育 12 小时，去掉培养基用 PBS 洗涤三遍，然后加入 2 mL 钙黄素 AM(终浓度：2 μM)和 PI(终浓度：8 μM)的混合液。37°C 孵育 30 分钟后，去除工作液，用 PBS 洗涤三遍，最后用倒置荧光显微镜观察细胞在不同条件下的荧光强度。

3.3 结果与讨论

3.3.1 表征

(1) CAP/NAADP@ZIF-8-FA 的表征

CAP/NAADP@ZIF-8-FA 是通过多步方法制备的。首先通过静电作用合成 ZIF-8 包裹的 CAP 和 NAADP 的 CAP/NAADP@ZIF-8 纳米颗粒，随后进一步在表面用 FA 修饰得到 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米材料，合成示意图如图 3-1 所示。

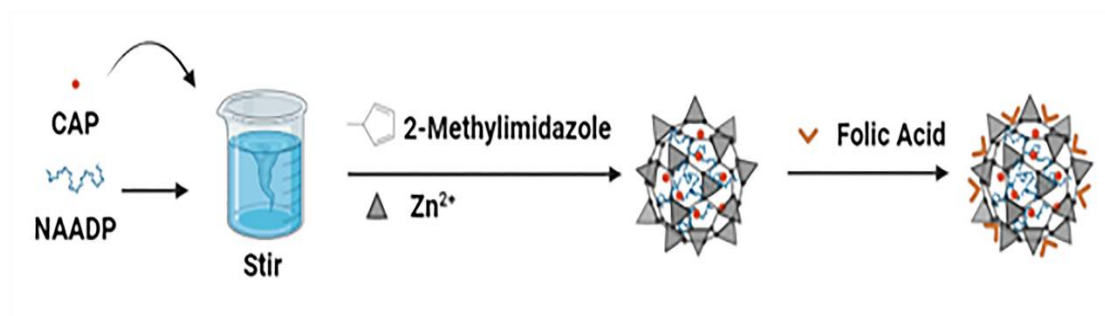


图 3-1. CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米材料的合成示意图

Figure 3-1. Synthesis diagram of CAP/NAADP@ZIF-8-FA nanomaterials

通过扫描电镜表征后得到 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的 SEM 图像(图 3-2A)。根据 SEM 图像显示, CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒形貌均一呈现六边形, 尺寸大约在 280 nm 左右。进一步通过 DLS 粒度分析仪检测 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的粒径为 280 nm (图 3-2B)。DLS 粒度分析仪的检测结果显示与 SEM 图一致, 证明了合成的 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒形貌均一且大小合适, 适用于抗肿瘤研究。

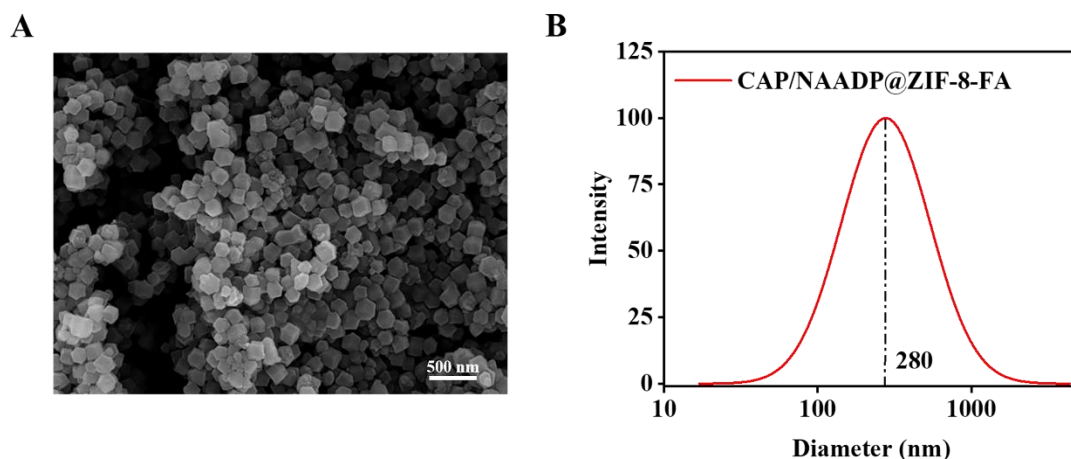


图 3-2. (A) CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的 SEM 图 (B) CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的粒径图

Figure 3-2. (A) SEM image of CAP/NAADP@ZIF-8-FA nanoparticles (B) Size map of CAP/NAADP@ZIF-8-FA nanoparticles

为了进一步验证 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的成功合成, 对 CAP、NAADP、FA 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒进行 ZETA 电位检测如图 3-3 所示。检测结果显示 CAP 和 NAADP 纳米颗粒的 ZETA 电位分别是 +10.95 mV 和 -7.94 mV, 被 ZIF-8 包裹后 CAP/NAADP@ZIF-8 的电位是 +8.32 mV。电位发

生变化表明了 CAP 和 NAADP 成功被 ZIF-8 包裹形成 CAP/NAADP@ZIF-8 纳米颗粒。后经过 FA 修饰后 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 的电位上升到+12.6 mV，证明了 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的成功合成。

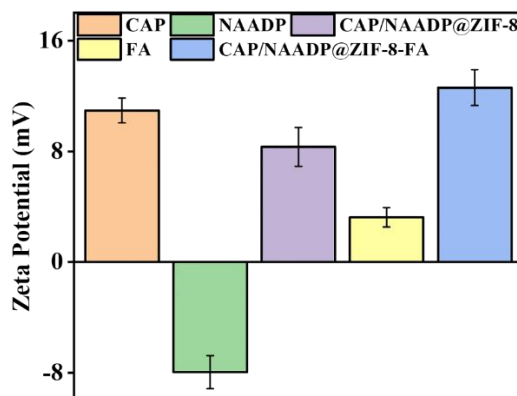


图 3-3. CAP、NAADP、FA 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的 ZETA 电位图

Figure 3-3. ZETA potentials of CAP, NAADP, FA and CAP/NAADP@ZIF-8-FA nanoparticles

进一步用紫外分光光度计分析 CAP、NAADP、FA 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒如图 3-4A 所示。NAADP 的紫外可见光谱在 260 nm 处有特征吸收峰，而当 NAADP 被 ZIF-8 包裹后形成的 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 紫外可见光谱在 260 nm 处的特征吸收峰消失，证明了 NAADP 成功被包载。FA 和 CAP 的紫外可见光谱同时在 280 nm 处出现特征吸收峰，FA 修饰后的 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 紫外可见光谱在 280 nm 处的吸收峰明显升高，进一步证明 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的成功合成。通过傅里叶红外光谱仪分析分析整个制备过程中官能团的变化，如图 3-4B 所示。从 CAP 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 红外光谱中可以看出，相比较于其他物质，只有两者在 2900cm^{-1} 处出现了相同的吸收峰，而 2900cm^{-1} 处的特征吸收是由 C-H 基团的伸缩振动引起的，证明了 CAP 成功被包载在终材料中。从 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 的光谱可以看出，在 1400cm^{-1} - 1500cm^{-1} 附近出现的峰对应于 CAP 和 FA 光谱中芳香环对应的特征峰。在 1590cm^{-1} 附近出现的峰对应于 ZIF-8 光谱中咪唑上 C=N 基团的伸缩振动，在 3300cm^{-1} 附近出现了与 NAADP 光谱相同的特征峰，这些结果表明了 ZIF-8 表面包覆了 FA 同时 CAP 和 NAADP 能够很好的嵌入纳米颗粒内部。

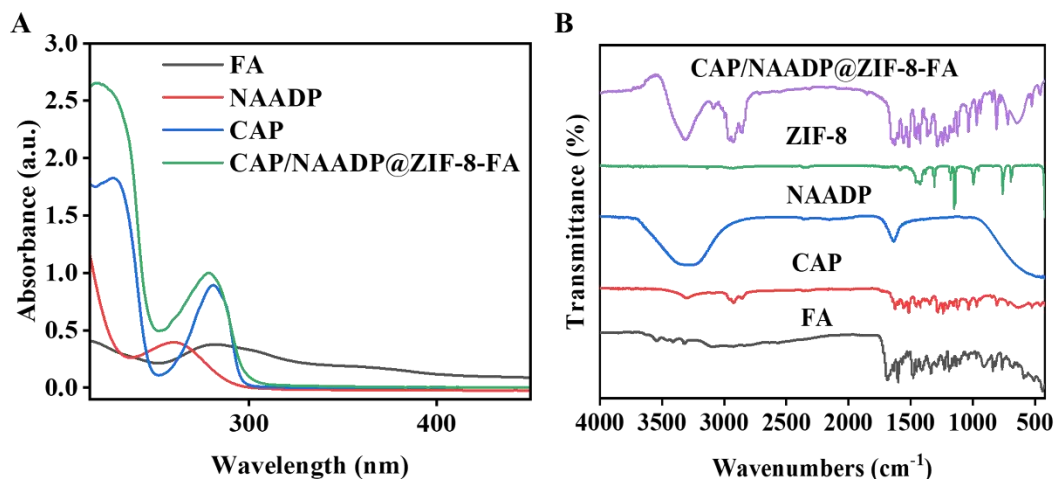


图 3-4. (A) CAP、NAADP、FA 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的紫外可见光谱 (B)

CAP、NAADP、FA、ZIF-8 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的傅里叶红外光谱

Figure 3-4. (A) UV-VIS spectra of CAP, NAADP, FA and CAP/NAADP@ZIF-8-FA nanoparticles

(B) FTIR spectra of CAP, NAADP, FA, ZIF-8 and CAP/NAADP@ZIF-8-FA nanoparticles

3.3.2 体外材料活性分析

(1) CAP/NAADP@ZIF-8-FA 中 NAADP 的负载率和释放效率

通过紫外可见分光光度法计算 NAADP 的负载率和从 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 中的释放效率。如图 3-5A 所示通过紫外可见分光光度法计算出 NAADP 的标准曲线公式为：

$$y = -0.02273 + 0.0691x$$

其中 y 为分光光度计测得的 OD 值， x 为 NAADP 的浓度。如图 3-5B 测得三组样品在 260 nm 处吸光度，通过插入标准曲线计算出 NAADP 的负载率为 $8.0 \pm 0.489\%$ 。最后根据 NAADP 的载药率和标准曲线测得 NAADP 在三种不同 pH 下的释放速率如图 3-5C 所示。在 pH 为 7.4 时，透析液中的 NAADP 浓度保持稳定，而在 pH 为 6.5 和 5.5 时，透析液中的 NAADP 浓度随着时间的增加显著增长，随着 pH 的降低 NAADP 释放的速率明显加快。结果表明 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒对 pH 响应性解离同时在弱酸环境下能够有效释放 NAADP。

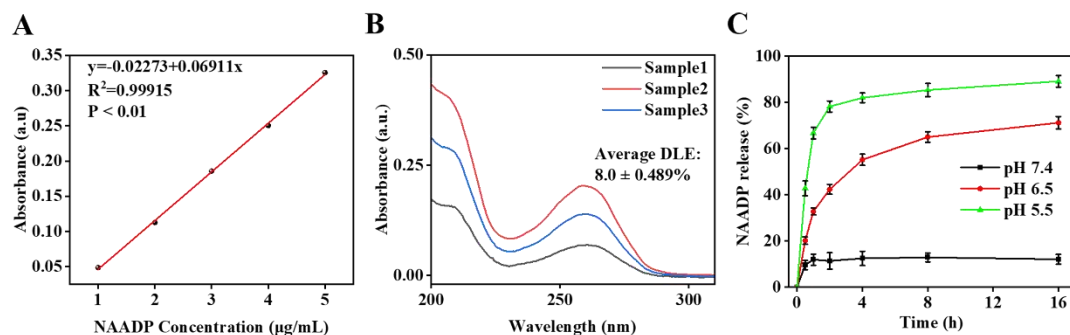


图 3-5. (A) NAADP 的标准曲线 (B) NAADP 的载药率 (C) NAADP 在不同 pH 下随时间变化的释放曲线

Figure 3-5. (A) Standard NAADP curve (B) Drug loading rate of NAADP (C) Release curve of NAADP with time at different pH

(2) 细胞毒性分析

采用 CCK-8 法体外评价 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的细胞毒性，将 L929 细胞与不同材料共孵育 24 小时后检测细胞毒性。如图 3-6A 所示 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 浓度的升高，L929 细胞的细胞活性并没有明显的影响，总体活性保持 75% 以上。如图 3-6B 所示，将 HepG2 细胞与不同材料共孵育 24 小时后，随着 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒浓度的增加，HepG2 细胞的细胞活性逐渐降低。当 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒浓度增加到 320 $\mu\text{g/mL}$ 时，可致 89% 的细胞死亡。这些结果证明了相比较与 L929 正常细胞 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒对 HepG2 癌细胞具有更强的毒副作用。

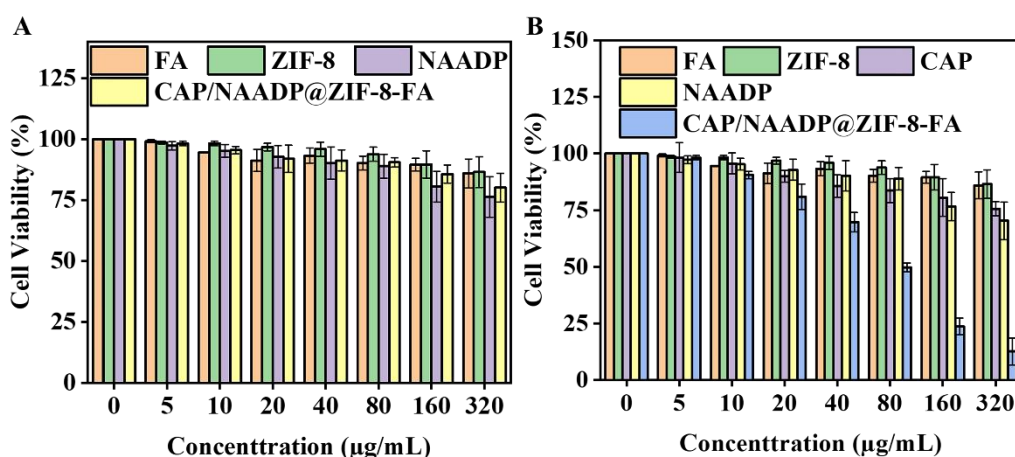


图 3-6. (A) 不同浓度的 FA、ZIF-8、NAADP 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒处理 L929 细胞后的细胞活力 (B) 不同浓度的 FA、ZIF-8、CAP、NAADP 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA

纳米颗粒处理 HepG2 细胞后的细胞活力

Figure 3-6. (A) Cell viability of L929 cells treated with different concentrations of FA, ZIF-8, NAADP and CAP/NAADP@ZIF-8-FA nanoparticles (B) Cell viability of HepG2 cells treated with FA, ZIF-8, CAP, NAADP and CAP/NAADP@ZIF-8-FA nanoparticles at different concentrations

(3) 细胞内 Ca^{2+} 含量分析

将 HepG2 细胞接种于六孔板，孵育一定时间后，采用 Fluo-4，AM 荧光染料监测不同实验组的胞内 Ca^{2+} 含量。如图 3-7A 所示，在倒置荧光显微镜观察下与 FA、ZIF-8 和 NAADP 共同孵育的细胞没有明显的绿色荧光信号，而与 CAP 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 共同孵育的细胞出现了明显的绿色荧光。相比较于单独的 CAP，CAP/NAADP@ZIF-8-FA 组的荧光信号更强烈。将处理后的细胞用钙离子检查试剂盒检查细胞中的 Ca^{2+} 含量，如图 3-7B 所示。CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒处理 HepG2 细胞后胞内的 Ca^{2+} 明显高于 NAADP 和 CAP 组，达到了对照组的 6 倍左右。这些实验结果证明了 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒相比较于单独的 CAP 和 NAADP 能够明显提高细胞内的 Ca^{2+} 浓度。

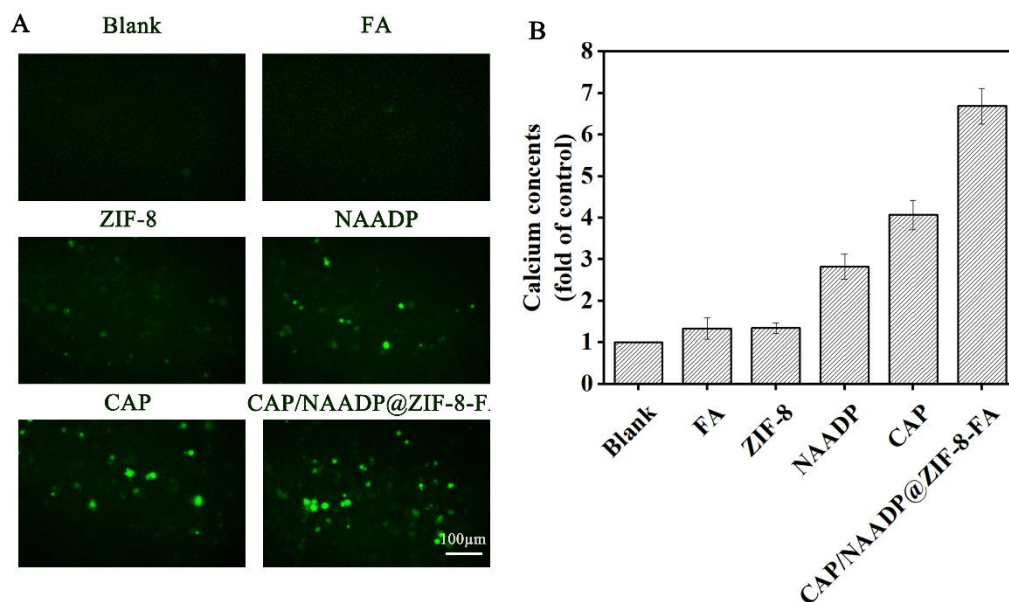


图 3-7. (A) 对照，ZIF-8，CAP，NAADP，FA 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 与 HepG2 细胞共同孵育后，通过 Fluo-4，AM 染色后的荧光图像 (B) 对照，ZIF-8，CAP，NAADP，FA 和 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 与 HepG2 细胞共同孵育后，胞内 Ca^{2+} 含量柱状图

Figure 3-7. (A) Fluorescence images of control, ZIF-8, CAP, NAADP, FA and

CAP/NAADP@ZIF-8-FA co-incubated with HepG2 cells and stained by Fluo-4, AM (B) Control, histogram of intracellular Ca^{2+} content of ZIF-8, CAP, NAADP, FA and CAP/NAADP@ZIF-8-FA after co-incubation with HepG2 cells

(4) 细胞活死染色实验分析

如图 3-8 所示, 经过不同材料处理的 HepG2 细胞用 Calcein-AM/PI 荧光标记后通过倒置荧光显微镜观察, 发现与单独的 CAP 组和 NAADP 组相比, CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒处理的 HepG2 细胞显示更多的红色荧光信号, 表明大部分细胞死亡。而其他组细胞仍保持良好的细胞形态, 呈现均匀分布的绿色荧光, 表明细胞存活良好。以上实验结果进一步证明, 与单纯的 CAP 和 NAADP 相比, CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒通过放大癌细胞内部的 Ca^{2+} 浓度导致 Ca^{2+} 超载介导肿瘤细胞凋亡。

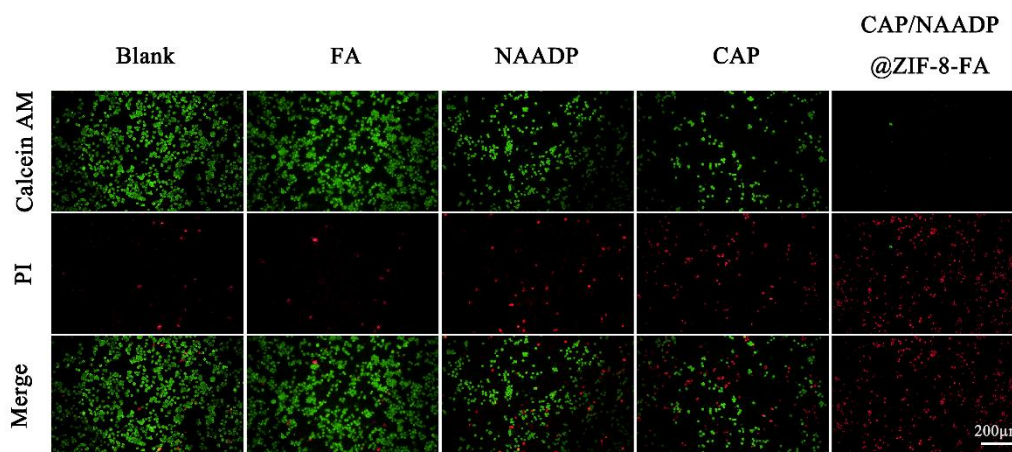


图 3-8. 不同材料处理 HepG2 细胞后的活死荧光染色图

Figure 3-8. Live and dead fluorescence staining of HepG2 cells treated with different materials

3.4 本章小结

本文基于钙超载抗肿瘤原理, 采用 NAADP 和 CAP 结合, 用酸敏材料 ZIF-8 包裹并用 FA 修饰合成了 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒。NAADP 可以激活细胞内肌质网和内质网上的 RYR1 通道使 Ca^{2+} 从内质网中流入胞质, 造成胞质中 Ca^{2+} 浓度大幅提高。同时 CAP 打开胞外的钙离子通道增强细胞对胞外 Ca^{2+} 的摄取, 提高胞内 Ca^{2+} 含量。ZIF-8 的酸敏特性和 FA 的靶向性使得 NAADP 和 CAP 可以很好的到达肿瘤区域。

通过紫外、红外、粒径和电位证明了 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒的成

功合成, 药物释放实验验证了 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒在弱酸环境下能有效释放 NAADP。通过细胞摄取证明了 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒能够靶向到肿瘤细胞表面, 细胞毒性、细胞活死以及胞内 Ca^{2+} 含量检测实验初步验证 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米颗粒能够提高肿瘤胞内 Ca^{2+} 含量造成钙超载从而杀死肿瘤细胞。

第 4 章结论与展望

4.1 结论

本文以钙超载抗肿瘤为基本原理设计并合成了两套纳米治疗平台。第一部分设计了具有更小毒副作用的新型 CAP 负载磷酸钙纳米颗粒，用于肿瘤微环境响应性药物释放和 TRPV1 激活的肿瘤特异性治疗。通过仿生矿化法将辣椒素、磷酸钙和牛血清蛋白结合形成稳定的纳米颗粒，最外层用 ZIF-8 包裹。由于肿瘤微酸性环境的特点，CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒在到达肿瘤部位后，会有效响应肿瘤微环境，快速降解并释放钙离子和 CAP。CAP 激活 HepG2 细胞膜上的 TRPV1 通道引起大量钙离子内流，造成胞内钙超载。释放的钙离子进一步放大钙超载，导致线粒体严重损伤，最终达到杀伤肿瘤的效果。体外细胞实验证实了 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒对正常细胞无明显毒性，对 HepG2 细胞的抑制率达到 71.65%。CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒处理的细胞，胞内 Ca^{2+} 含量明显升高。在建立的动物模型实验中，CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒同样显示出良好的抗肿瘤效果，肿瘤内部 Ca^{2+} 含量明显升高达到对照组的 20 倍左右。本研究通过放大肿瘤胞内 Ca^{2+} 浓度造成钙超载从而杀死肿瘤，为进一步研究钙超载抗肿瘤治疗提供了基础。

在研究过程中，发现 CAP/BSA@TCP-ZIF-8 纳米颗粒虽然能够很好的放大肿瘤钙超载从而杀死肿瘤，但是采用磷酸钙提供外源钙，钙的利用率较低还有大量钙分散在细胞外，对其他正常细胞造成一定的影响。为此在原有的基础上，采用 NAADP 替换磷酸钙，它可以激活细胞内肌质网和内质网上的 RYR1 通道使 Ca^{2+} 从内质网中流入胞质，造成胞质中 Ca^{2+} 浓度大幅提高。它直接从细胞自身的钙库中释放钙离子，提供内源钙。提高了钙的利用率减少胞外不必要钙离子，提高生物安全性。同因为原先的材料并无主动靶向的能力，针对这一点选择 FA 进行修饰提高靶向能力，使药物精确到达肿瘤区域。因此第三章设计了 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米平台。通过 CAP 打开胞外钙离子通道增强细胞对胞外 Ca^{2+} 的摄取，同时 NAADP 激活细胞内肌质网和内质网上的 RYR1 通道使

Ca^{2+} 从内质网中流入胞质,造成胞内 Ca^{2+} 浓度大幅提高从而杀死细胞。通过 SEM、UV-vis、FTIR 等表征,证明了成功合成 CAP/NAADP@ZIF-8-FA。在体外细胞实验中,以 HepG2 细胞为研究对象开展了后面的其他实验,证明了该纳米材料能够更加安全高效的放大钙超载从而杀死肿瘤。本研究对钙超载治疗纳米平台的设计提供了一定的实验基础。

总之,以上构建的两种以钙超载为基础的酸敏型纳米载药体系均能放大癌细胞内部的 Ca^{2+} 含量达到钙超载从而杀死细胞,具有良好的抗肿瘤效果,对钙超载药物的设计具有参考价值。

4.2 展望

综上所述,本文基于钙超载治疗方法,以 ZIF-8 为药物载体,通过放大胞内钙含量从而抑制肿瘤生长。但在完成上述的实验过程中发现依然有许多问题亟待优化和解决:

(1) 在构建载药体系时,发现金属有机框架可以使用 Ca^{2+} 作为主要元素,这样不仅可以提高材料在生物体内的相容性外,而且能够提供充足的 Ca^{2+} 增强胞内钙超载。

(2) 本论文在 CAP/NAADP@ZIF-8-FA 纳米粒子对 HepG2 细胞的作用机制研究停留在表面,具体的深入作用仍需要继续研究。并且验证性实验并未涉及动物层面,虽然体外细胞实验中,CCK-8 实验和 Ca^{2+} 含量实验的结果初步证明该纳米粒子具有增强钙超载抗肿瘤作用,然而具体应用到小鼠体内仍需深入探究。

参考文献

- [1] LI Z, FEIYUE Z, GAO FENG L. Traditional Chinese medicine and lung cancer-From theory to practice [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 137, 111381-111381.
- [2] LIU C, WANG M, ZHANG H, et al. Tumor microenvironment and immunotherapy of oral cancer [J]. *European Journal of Medical Research*, 2022, 27(1):198-198.
- [3] HE W, LI Q, LU Y, et al. Cancer Treatment Evolution from Traditional Methods to Stem Cells and Gene Therapy [J]. *Current Gene Therapy*, 2022, 22(5): 368-385.
- [4] GAO M, YANG T, QIN W, et al. Cell Membrane-Anchoring Nano-Photosensitizer for Light-Controlled Calcium-Overload and Tumor-Specific Synergistic Therapy [J]. *Small*, 2022, 18(48):e2204689-e2204689.
- [5] YAGLOVA N V, TIMOKHINA E P, OBERNIKHIN S S, et al. Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4):3107-3107.
- [6] XING G, MENG L, CAO S, et al. PPAR α alleviates iron overload-induced ferroptosis in mouse liver [J]. *Embo Reports*, 2022, 23(8):e52280-e52280.
- [7] DU W, GU M, HU M, et al. Lysosomal Zn²⁺ release triggers rapid, mitochondria-mediated, non-apoptotic cell death in metastatic melanoma [J]. *Cell Reports*, 2021, 37(3):109848-109848.
- [8] XIAO Y, YU D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2021, 221,107753-107753.
- [9] SHARIFI M, CHO W C, ANSARIESFAHANI A, et al. An Updated Review on EPR-Based Solid Tumor Targeting Nanocarriers for Cancer Treatment [J]. *Cancers*, 2022, 14(12):2868-2868.
- [10] ZHAO P, LI H, BU W. A Forward Vision for Chemodynamic Therapy: Issues and Opportunities [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2023, 62(7):e202210415-e202210415.
- [11] ZHANG C, BU W, NI D, et al. Synthesis of Iron Nanometallic Glasses and Their Application in Cancer Therapy by a Localized Fenton Reaction [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2016, 55(6): 2101-2106.
- [12] ZHANG L, LI C-X, WAN S-S, et al. Nanocatalyst-Mediated Chemodynamic Tumor Therapy [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2022, 11(2):e2101971-e2101971.
- [13] KWIATKOWSKI S, KNAP B, PRZYSTUPSKI D, et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 106: 1098-1107.
- [14] GUSTALIK J, AEBISHER D, BARTUSIK-AEBISHER D. Photodynamic therapy in breast cancer treatment [J]. *Journal of Applied Biomedicine*, 2022, 20(3): 98-105.
- [15] SHU P, LIANG H, ZHANG J, et al. Reactive oxygen species formation and its effect on CD4⁺ T cell-mediated inflammation [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14,1199233-1199233.
- [16] CORREIA J H, RODRIGUES J A, PIMENTA S, et al. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(9):1332-1332.
- [17] HOU Y-J, YANG X-X, LIU R-Q, et al. Pathological Mechanism of Photodynamic Therapy and Photothermal Therapy Based on Nanoparticles [J]. *International Journal of Nanomedicine*,

- 2020, 15: 6827-6838.
- [18] ZHANG G, SUN J, ZHANG X. A novel Cuproptosis-related LncRNA signature to predict prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1):11325-11325.
- [19] WANG M, ZHENG L, MA S, et al. Cuproptosis: emerging biomarkers and potential therapeutics in cancers [J]. Frontiers in Oncology, 2023, 13,1288504-1288504.
- [20] LEANZA L, ZORATTI M, GULBINS E, et al. Mitochondrial ion channels as oncological targets [J]. Oncogene, 2014, 33(49): 5569-5581.
- [21] STRUBBE-RIVERA J O, CHEN J, WEST B A, et al. Modeling the Effects of Calcium Overload on Mitochondrial Ultrastructural Remodeling [J]. Applied Sciences-Basel, 2021, 11(5):2071-2071.
- [22] DUCHEN M R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death [J]. The Journal of physiology, 2000, 529 Pt 1: 57-68.
- [23] CALVO-RODRIGUEZ M, BACSKAI B J. Mitochondria and Calcium in Alzheimer's Disease: From Cell Signaling to Neuronal Cell Death [J]. Trends in Neurosciences, 2021, 44(2): 136-151.
- [24] ZHOU M, LI B, LI N, et al. Regulation of Ca²⁺ for Cancer Cell Apoptosis through Photothermal Conjugated Nanoparticles [J]. ACS applied bio materials, 2022, 5(6): 2834-2842.
- [25] 戴冠东. TWIST1 缓解金黄色葡萄球菌骨髓炎中炎性微环境诱导的巨噬细胞钙超载和细胞凋亡的机制研究 [D], 南方医科大学, 2023.
- [26] MCKENZIE M, LIM S C, DUCHEN M R. Simultaneous Measurement of Mitochondrial Calcium and Mitochondrial Membrane Potential in Live Cells by Fluorescent Microscopy [J]. Jove-Journal of Visualized Experiments, 2017, (119).
- [27] SHARAF M S, STEVENS D, KAMUNDE C. Zinc and calcium alter the relationship between mitochondrial respiration, ROS and membrane potential in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver mitochondria [J]. Aquatic Toxicology, 2017, 189: 170-183.
- [28] YAO J, PENG H, QIU Y, et al. Nanoplatform-mediated calcium overload for cancer therapy [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2022, 10(10): 1508-1519.
- [29] ZHU J, JIAO A, LI Q, et al. Mitochondrial Ca²⁺-overloading by oxygen/glutathione depletion-boosted photodynamic therapy based on a CaCO₃ nanoplatform for tumor synergistic therapy [J]. Acta Biomaterialia, 2022, 137: 252-261.
- [30] BONORA M, PATERGNANI S, RAMACCINI D, et al. Physiopathology of the Permeability Transition Pore: Molecular Mechanisms in Human Pathology [J]. Biomolecules, 2020, 10(7).
- [31] ZHANG M, SONG R, LIU Y, et al. Calcium-Overload-Mediated Tumor Therapy by Calcium Peroxide Nanoparticles [J]. Chem, 2019, 5(8): 2171-2182.
- [32] LIU J W, YANG Y G, WANG K, et al. Activation and Monitoring of mtDNA Damage in Cancer Cells via the "Proton-Triggered" Decomposition of an Ultrathin Nanosheet [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021, 13(3): 3669-3678.
- [33] PAN T, FU W, XIN H, et al. Calcium Phosphate Mineralized Black Phosphorous with Enhanced Functionality and Anticancer Bioactivity [J]. Advanced Functional Materials, 2020, 30(38).
- [34] SUKUMARAN P, DA CONCEICAO V N, SUN Y, et al. Calcium Signaling Regulates Autophagy and Apoptosis [J]. Cells, 2021, 10(8):2125-2125.
- [35] DAVERKAUSEN-FISCHER L, PRLS F. Regulation of calcium homeostasis and flux

- between the endoplasmic reticulum and the cytosol [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(7):102061-102061.
- [36] ZHENG P, DING B, SHI R, et al. A Multichannel Ca^{2+} Nanomodulator for Multilevel Mitochondrial Destruction-Mediated Cancer Therapy [J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(15):e2007426-e2007426.
- [37] GUERRA A R, DUARTE M F, DUARTE I F. Targeting Tumor Metabolism with Plant-Derived Natural Products: Emerging Trends in Cancer Therapy [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(41): 10663-10685.
- [38] AL-SAMYDAI A, ALSHAER W, AL-DUJAILI E A S, et al. Preparation, Characterization, and Anticancer Effects of Capsaicin-Loaded Nanoliposomes [J]. *Nutrients*, 2021, 13(11):3995-3995.
- [39] XU M, ZHANG J, MU Y, et al. Activation of TRPV1 by capsaicin-loaded CaCO_3 nanoparticle for tumor-specific therapy [J]. *Biomaterials*, 2022, 284,121520-11520.
- [40] WANING J, VRIENS J, OWSIANIK G, et al. A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration [J]. *Cell calcium*, 2007, 42(1): 17-25.
- [41] LI F, WANG F. TRPV1 in Pain and Itch [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2021, 1349: 249-273.
- [42] BUJAK J K, KOSMALA D, SZOPA W M, et al. Inflammation, Cancer and Immunity-Implication of TRPV1 Channel [J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9,1087-1087.
- [43] MUNJULURI S, WILKERSON D A, SOOCH G, et al. Capsaicin and TRPV1 Channels in the Cardiovascular System: The Role of Inflammation [J]. *Cells*, 2022, 11(1):18-18.
- [44] WANG S, YAMAMOTO S, KOGURE Y, et al. Partial Activation and Inhibition of TRPV1 Channels by Evodiamine and Rutaecarpine, Two Major Components of the Fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(5): 1225-1230.
- [45] SUN Q, LIU B, ZHAO R, et al. Calcium Peroxide-Based Nanosystem with Cancer Microenvironment-Activated Capabilities for Imaging Guided Combination Therapy via Mitochondrial Ca^{2+} Overload and Chemotherapy [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(37): 44096-44107.
- [46] GROENENDYK J, AGELLON L B, MICHALAK M. Calcium signaling and endoplasmic reticulum stress [M]//MARCHI S, GALLUZZI L. *Inter-Organellar Ca^{2+} Signaling in Health and Disease - Pt B*. 2021: 1-20.
- [47] ARBABIAN A, BROULAND J-P, GELEBART P, et al. Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer [J]. *Biofactors*, 2011, 37(3): 139-149.
- [48] GROENENDYK J, MICHALAK M. Interplay between calcium and endoplasmic reticulum stress [J]. *Cell Calcium*, 2023, 113,102753-102753.
- [49] CHU X, JIANG X, LIU Y, et al. Nitric Oxide Modulating Calcium Store for Ca^{2+} -Initiated Cancer Therapy [J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31(13).
- [50] ZHENG P, DING B, JIANG Z, et al. Ultrasound-Augmented Mitochondrial Calcium Ion Overload by Calcium Nanomodulator to Induce Immunogenic Cell Death [J]. *Nano Letters*, 2021, 21(5): 2088-2093.
- [51] ZHOU F, YANG Y, LIU Y, et al. A calcium hydroxide/oleic acid/phospholipid nanoparticle induced cancer cell apoptosis by the combination of intracellular calcium overload and lactic acidosis elimination [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2023, 11(25): 5856-5869.
- [52] PARK K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back [J]. *Journal of*

- Controlled Release, 2014, 190: 3-8.
- [53] 肖箫, 陈俊宇, 李彩霞, et al. 纳米载体作为药物递送系统的临床应用和药代动力学研究
药学报 [J]. 2023, 58(04): 856-866.
- [54] LI C, WANG Z, LEI H, et al. Recent progress in nanotechnology-based drug carriers for
resveratrol delivery [J]. Drug Delivery, 2023, 30(1):2174206-2174206.
- [55] KASHAPOV R, GAYNANOVA G, GABDRAKHMANOV D, et al. Self-Assembly of
Amphiphilic Compounds as a Versatile Tool for Construction of Nanoscale Drug Carriers [J].
International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(18):6961-6961.
- [56] DADWAL A, BALDI A, NARANG R K. Nanoparticles as carriers for drug delivery in cancer
[J]. Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology, 2018, 46: 295-305.
- [57] NICHOLS J W, SAKURAI Y, HARASHIMA H, et al. Nano-sized drug carriers: Extravasation,
intratumoral distribution, and their modeling [J]. Journal of Controlled Release, 2017, 267:
31-46.
- [58] GUNGOR S, KAHRAMAN E. Nanocarriers Mediated Cutaneous Drug Delivery [J].
European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021, 158,105638-105638.
- [59] XIONG Y, XU Z, LI Z. Polydopamine-Based Nanocarriers for Photosensitizer Delivery [J].
Frontiers in Chemistry, 2019, 7,471-471.
- [60] QU F, GENG R, LIU Y, et al. Advanced nanocarrier- and microneedle-based transdermal drug
delivery strategies for skin diseases treatment [J]. Theranostics, 2022, 12(7): 3372-3406.
- [61] TANG F, LI L, CHEN D. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and
Drug Delivery [J]. Advanced Materials, 2012, 24(12): 1504-1534.
- [62] MOSLEH-SHIRAZI S, ABBASI M, MOADDELI M R, et al. Nanotechnology Advances in
the Detection and Treatment of Cancer: An Overview [J]. Nanotheranostics, 2022, 6(4):
400-423.
- [63] ABLA K K, MEHANNA M M. The battle of lipid-based nanocarriers against blood-brain
barrier: a critical review [J]. Journal of Drug Targeting, 2023, 31(8): 832-857.
- [64] LIANG R, WU C, LIU S, et al. Targeting interleukin-13 receptor $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$) for
glioblastoma therapy with surface functionalized nanocarriers [J]. Drug Delivery, 2022, 29(1):
1620-1630.
- [65] SHI Y, VAN DER MEEL R, CHEN X, et al. The EPR effect and beyond: Strategies to
improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy [J]. Theranostics, 2020,
10(17): 7921-7924.
- [66] LIANG W, WIED P, CARRARO F, et al. Metal-Organic Framework-Based Enzyme
Biocomposites [J]. Chemical Reviews, 2021, 121(3): 1077-1129.
- [67] GILIOPOULOS D, ZAMBOULIS A, GIANNAKOUDAKIS D, et al. Polymer/Metal Organic
Framework (MOF) Nanocomposites for Biomedical Applications [J]. Molecules, 2020,
25(1):185-185.
- [68] RABIEE N, BAGHERZADEH M, JOUYANDEH M, et al. Natural Polymers Decorated
MOF-MXene Nanocarriers for Co-delivery of Doxorubicin/pCRISPR [J]. ACS applied bio
materials, 2021, 4(6): 5106-5121.
- [69] ZHANG Q, KUANG G, WANG H, et al. Multi-Bioinspired MOF Delivery Systems from
Microfluidics for Tumor Multimodal Therapy [J]. Advanced Science, 2023,
10(33):e2303818-e2303818.
- [70] CAO J, LI X, TIAN H. Metal-Organic Framework (MOF)-Based Drug Delivery [J]. Current

- Medicinal Chemistry, 2020, 27(35): 5949-5969.
- [71] HU S, YAN C, FEI Q, et al. MOF-based stimuli-responsive controlled release nanopesticide: mini review [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2023, 11,1272725-1272725.
 - [72] ZONG Z, TIAN G, WANG J, et al. Recent Advances in Metal-Organic-Framework-Based Nanocarriers for Controllable Drug Delivery and Release [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(12).
 - [73] BRAGA FERREIRA L G, FARIA J V, SALLES DOS SANTOS J P, et al. Capsaicin: TRPV1-independent mechanisms and novel therapeutic possibilities [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2020, 887-887.
 - [74] MARCHANT J S, GUNARATNE G S, CAI X, et al. NAADP-binding proteins find their identity [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2022, 47(3): 235-249.
 - [75] PESAKHOV S, NACHLIELY M, BARVISH Z, et al. Cancer-selective cytotoxic Ca^{2+} overload in acute myeloid leukemia cells and attenuation of disease progression in mice by synergistically acting polyphenols curcumin and carnosic acid [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 31847-31861.
 - [76] WALKON L L, STRUBBE-RIVERA J O, BAZIL J N. Calcium Overload and Mitochondrial Metabolism [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(12):1891-1891.
 - [77] XU S, CHENG X, WU L, et al. Capsaicin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in anaplastic thyroid carcinoma cells *via* TRPV1-mediated mitochondrial calcium overload [J]. *Cellular Signalling*, 2020, 75,109733-109733.
 - [78] ZHANG H, CHEN Z, ZHANG A, et al. The Role of Calcium Signaling in Melanoma [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3):1010-1010.
 - [79] LI Q, CHAO Y, LIU B, et al. Disulfiram loaded calcium phosphate nanoparticles for enhanced cancer immunotherapy [J]. *Biomaterials*, 2022, 291,121880-121880.
 - [80] DING M, LIU W, GREF R. Nanoscale MOFs: From synthesis to drug delivery and theranostics applications [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2022, 190,114496-114496.
 - [81] ABEDNATANZI S, DERA KHSHANDEH P G, DEPAUW H, et al. Mixed-metal metal-organic frameworks [J]. *Chemical Society Reviews*, 2019, 48(9): 2535-2565.
 - [82] JOYARAMULU K, GEYER F, SCHNEEMANN A, et al. Hydrophobic Metal-Organic Frameworks [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(32):e1900820-e1900820.
 - [83] BIGDELI F, LOLLAR C T, MORSALI A, et al. Switching in Metal-Organic Frameworks [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2020, 59(12): 4652-4669.
 - [84] KANG W, TIAN Y, ZHAO Y, et al. Applications of nanocomposites based on zeolitic imidazolate framework-8 in photodynamic and synergistic anti-tumor therapy [J]. *Rsc Advances*, 2022, 12(26): 16927-16941.
 - [85] ABDELHAMID H N. Zeolitic Imidazolate Frameworks (ZIF-8) for Biomedical Applications: A Review [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2021, 28(34): 7023-7075.
 - [86] WANG M, ZHANG M, FU L, et al. Liver-targeted delivery of TSG-6 by calcium phosphate nanoparticles for the management of liver fibrosis [J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 36-49.
 - [87] SATTLER K, EL-BATRAWY I, CYGANER L, et al. TRPV1 activation and internalization is part of the LPS-induced inflammation in human iPSC-derived cardiomyocytes [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1):14689-14689.
 - [88] WANG Q, ZHANG C, YANG C, et al. Capsaicin Alleviates Vascular Endothelial Dysfunction and Cardiomyopathy via TRPV1/eNOS Pathway in Diabetic Rats [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022,6482363-6482363.

- [89] KATO K, LEE S, NAGATA F. Preparation of Protein-Peptide-Calcium Phosphate Composites for Controlled Protein Release [J]. *Molecules*, 2020, 25(10):2312-2312.
- [90] OBAID E A M S, WU S, ZHONG Y, et al. pH-Responsive hyaluronic acid-enveloped ZIF-8 nanoparticles for anti-atherosclerosis therapy [J]. *Biomaterials Science*, 2022, 10(17): 4837-4847.
- [91] LIU B, WANG D, LUO E, et al. Role of TG2-Mediated SERCA2 Serotonylation on Hypoxic Pulmonary Vein Remodeling [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 10,1611-1611.
- [92] QIAN R, JING B, JIANG D, et al. Multi-antitumor therapy and synchronous imaging monitoring based on exosome [J]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2022, 49(8): 2668-2681.
- [93] HU J-J, YUAN L, ZHANG Y, et al. Photo-Controlled Calcium Overload from Endogenous Sources for Tumor Therapy [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2024,e202317578-e202317578.
- [94] PERRONE M, PATERGNANI S, DI MAMBRO T, et al. Calcium Homeostasis in the Control of Mitophagy [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2023, 38(7-9): 581-598.
- [95] LIN-MOSHIER Y, KEEBLER M V, HOOPER R, et al. The Two-pore channel (TPC) interactome unmasks isoform-specific roles for TPCs in endolysosomal morphology and cell pigmentation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(36): 13087-13092.
- [96] WALSETH T F, GUSE A H. NAADP: From Discovery to Mechanism [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12,703326-703326.
- [97] MI X, HU M, DONG M, et al. Folic Acid Decorated Zeolitic Imidazolate Framework (ZIF-8) Loaded with Baicalin as a Nano-Drug Delivery System for Breast Cancer Therapy [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2021, 16: 8337-8352.
- [98] NAWAZ F Z, KIPREOS E T. Emerging roles for folate receptor FOLR1 in signaling and cancer [J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2022, 33(3): 159-174.

学术成果

1.Yuan Gao, Jun Wang, Weiwei Zhang, Fei Ge, Wanzhen Li, Feiyang Xu, Ting Cui, Xing Li, Kai Yang, Yugui Tao.The MOF system loaded with capsaicin and calcium phosphate was utilized for tumor therapy involving calcium overload[J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.

2.郇远, 郑鹏, 李兴, 崔婷, 许飞扬, 陶玉贵.酸敏型 ZIF-8 负载辣椒素/NAADP 载药体系的构建及其抗肿瘤研究[J].安徽工程大学学报.

3.Ting Cui, Feiyang Xu, Jun Wang, Wanzhen Li, Yuan Gao, Xing Li , Kai Yang , Weiwei Zhang, Fei Ge, Yugui Tao. Polydopamine Nanocarriers with Cascade-activated Nitric Oxide Release Combined Photothermal Activity for the Therapy of Drug-resistant Bacterial Infections [J]. ACS Infectious Diseases.

4.Xing Li, Jun Wang, Wanzhen Li, Feiyang Xu, Yuan Gao, Ting Cui , Kai Yang , Weiwei Zhang, Fei Ge, Yugui Tao. Combined Photothermal/Chemotherapeutic Approach Using ZIF-8-Supported Artesunate and Gold Nanorods [J]. ACS Applied Nano Materials.

5.Feiyang Xu, Ting Cui, Jun Wang, Wanzhen Li, Yuan Gao, Xing Li , Kai Yang , Weiwei Zhang, Fei Ge, Yugui Tao. Quaternized Silk Fibroin Nanocarriers Loaded with Chlorin e6 for Photodynamic Elimination of Drug-Resistant Bacteria and Biofilms[J]. ACS Applied Nano Materials.

致谢

时光荏苒，转眼间，我的硕士研究生生涯即将画上句号。在这段充满挑战与成长的旅程中，我收获了许多宝贵的经验和知识，也结识了许多优秀的师长和朋友。在此，我想向所有在我求学之路上给予过帮助和支持的人们表达我最真挚的感谢。

首先，我要感谢我的导师陶玉贵教授。在我研究生阶段的学习和研究中，给予了我悉心的指导和耐心的教诲。张伟伟、葛飞、王军和李婉珍的学术指导，不仅让我在学术上取得了进步，更让我懂得了如何做学问、如何做人。导师严谨的治学态度、渊博的学识和高尚的品德，也将一直激励着我在未来的人生道路上不断前行。

其次，我要感谢我的父母和家人。他们始终是我坚实的后盾和温暖的港湾，他们的无私奉献和默默支持，让我能够全心全意地投入到学习和研究中。他们对我的爱和信任，是我前进的动力，也是我克服困难的勇气。

我还要感谢我的朋友们郑鹏、黎玮和韩肋撒。在研究生生涯中，我们共同学习、共同进步，一起度过了许多难忘的时光。在我遇到困难和挫折时，他们总是给予我鼓励和帮助，让我感受到了友谊的力量。还有我的女朋友让我感受到了温暖与力量。

同时，我也要感谢课题组的各位同僚们李兴、沈海东、崔婷和许飞杨。他们与我一起度过了一个丰富和精彩的研究生生活，让我学习多很多也成长很多。

最后，我要感谢国家和社会为我提供了这样一个学习和发展的机会。我将不忘初心，牢记使命，以自己的所学和所能，为国家和社会的发展贡献自己的力量。

在这里，我还要向所有在我硕士论文撰写过程中给予过帮助的人们表示感谢，感谢他们在论文调研、数据收集和分析等方面提供的建议和指导。硕士研究生生涯是我人生中一段宝贵的经历，它让我更加坚定了自己的人生目标和追求。在未来的日子里，我将继续努力，不断学习和进步，以更好的自己回报所有关心和支持我的人。