

中空 MnO_2 纳米载体增强 Cy7 肿瘤靶向性及光动力治疗

李汉祥

(青岛大学化学化工学院, 山东省青岛市, 266100; 1539414024@qq.com)

摘 要: 肿瘤微环境响应型药物递送系统的开发是提高光动力治疗 (PDT) 特异性和疗效的关键挑战。本研究设计了一种基于中空二氧化锰 (H-MnO_2) 纳米载体负载 Cy7 近红外荧光染料智能递送系统 (Cy7@MnO_2)，用于实现肿瘤微环境响应的精准光动力治疗。通过硬模板法合成了具有中空结构的 MnO_2 纳米载体，并采用物理吸附法高效负载 Cy7 染料。实验结果表明，该递送系统在正常生理条件下保持稳定， H-MnO_2 载体能有效屏蔽 Cy7 的光敏活性；而在模拟肿瘤微环境中可快速释放 Cy7。体外细胞实验证实， Cy7@MnO_2 在激光照射下对 4T1 肿瘤细胞的杀伤效率达 82.3%，显著高于游离 Cy7 组 (62.9%)。这种“微环境响应+光控激活”的双重靶向策略为肿瘤的精准治疗提供了新思路。

关键词: 中空二氧化锰; Cy7; 肿瘤微环境; 光动力学治疗

引言

中空二氧化锰 (H-MnO_2) 纳米材料因其独特的结构和理化性质，近年来在生物医学领域受到广泛关注[1, 2]。与传统 MnO_2 纳米颗粒相比，中空结构具有更高的比表面积和负载能力，可高效封装药物或荧光分子，并实现可控释放[3]。 MnO_2 在肿瘤微环境 (TME) 中表现出多重响应性：在弱酸性条件下 (pH 6.5-6.9) 可被还原为 Mn^{2+} ，同时消耗过表达的谷胱甘肽 (GSH)，破坏肿瘤细胞的氧化还原平衡[4, 5]。此外， MnO_2 与过氧化氢 (H_2O_2) 反应可生成 O_2 ，缓解肿瘤缺氧，增强光动力治疗 (PDT) 效果[6-8]。近年来，研究者通过模板法、自组装等方法制备了不同形貌的中空 MnO_2 纳米材料，用于药物递送、化学动力学治疗 (CDT) 和磁共振成像 (MRI) [9-12]。然而，单纯 MnO_2 纳米材料在近红外区的光学惰性限制了其在荧光成像中的应用，亟需与光学活性物质结合，构建多功能纳米诊疗平台。

Cy7 作为一种近红外 (NIR) 荧光染料，不仅具有良好的光学成像特性，更因其出色的光动力治疗 (PDT) 潜力而备受瞩目[13-15]。其激发波长 ($\approx 750 \text{ nm}$) 位于生物组织的光学治疗窗口，能够实现较深的组织穿透深度，有效激活肿瘤深部的敏光反应[16]。与传统光敏剂相比，Cy7 具有更高的单线态氧量子产率和更优异的光稳定性，在激光照射下能高效产生活性氧 (ROS)，实现对肿瘤细胞的精准杀伤。然而，游离 Cy7 通常缺乏肿瘤靶向性，在全身给药时可能因非特异性分布导致正常组织的光毒性损伤[17]。现有研究主要通过纳米载体递送来改善 Cy7 的靶向性，但常规递送系统往往无法实现肿瘤微环境触发的特异性释放[18-20]。因此，开发一种能响应肿瘤微环境、选择性释放并激活 Cy7 的智能递送系统，对于实现安全高效的光动力治疗具有重要意义。

基于此，本研究设计了一种中空 MnO_2 纳米载体负载 Cy7 的智能递送系统 (Cy7@MnO_2)。该体系通过双重激活机制实现精准调控：在正常组织中， MnO_2 壳层完整包裹 Cy7，有效阻隔其光敏活性；而在肿瘤部位，弱酸性和高 H_2O_2 微环境触发 MnO_2 分解，实现 Cy7 的特异性释放后，再通过近红外激光 ($\approx 750 \text{ nm}$) 选择性激活其光动力效应。这一系统的优势在于：(1) H_2O_2 响应性分解确保肿瘤部位特异性药物释放；(2) MnO_2 分解生成的 O_2 缓解肿瘤缺氧；(3) 激光时空精准控制确保 Cy7 仅在靶部位产生活性氧。这种“微环境响应+光控激活”的双重门控设计，既从根本上避免了系统毒性，又通过代谢调控与光敏作用的协同效应显著提升了治疗效果。

1 实验部分

1.1 实验药品

实验所用商业试剂和溶剂均为分析纯级别，未进行二次纯化可直接使用。实验中使用的所有试剂均购自阿拉丁试剂公司（中国，北京）。正硅酸四乙酯（TEOS）、氨水、高锰酸钾、碳酸钾购自国药化学试剂有限公司（中国，上海）。GSH 购自希恩思生化科技有限公司（中国，天津）。

1.2 实验仪器

透射电镜（TEM）图像使用 HT-7700 Exalens 透射电子显微镜（电子，日本）获得。Zeta 电位由马尔文 Zetasizer Nano ZSE 测量。MTT 法使用酶标仪（Synerge2, Biotek, USA）检测吸光度。在 Bruker Avance 光谱仪上记录了 ^1H NMR 谱。高分辨率质谱（HR-MS）由 Bruker ultrafleXtremeTM 质谱系统获得。紫外-可见吸收光谱由 TU-1901 紫外可见分光光度计（岛津，日本）获得。XRD 采用 Ultima IV 型 X 射线衍射仪（理学，日本）测定。

Cy7 的合成

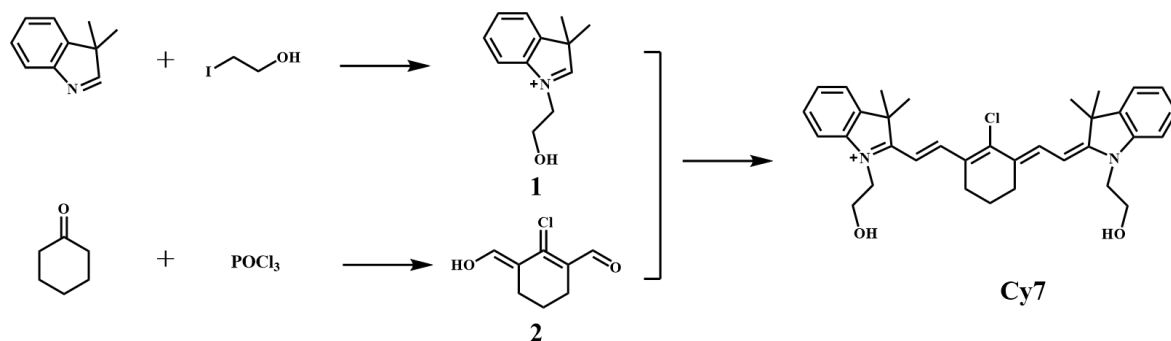


图 1 Cy7 的合成路线

如图 1 所示的是目标化合物 Cy7 的合成路线，其具体合成步骤如下：

化合物的 1 合成。

在氮气保护下，将 2,3,3-三甲基-3H-吲哚（10.0 g，63 mmol）和 2-碘乙醇（15 g，88 mmol）溶于乙腈（100 mL），加热回流 24 h。反应完成后，冷却至室温，加入正己烷使产物析出。经抽滤收集紫色固体，干燥后直接用于后续反应。产量：90%。

（1）化合物 2 的合成

在冰浴冷却条件下，将三氯氧磷（9 mL，58 mmol）逐滴加入含有 DMF（10 mL，273 mmol）和无水二氯甲烷（20 mL）的混合溶液中。随后，缓慢滴加环己酮（2.5 g，25 mmol），并将反应体系升温至 80°C，剧烈搅拌 3 h。反应完成后，将混合物冰水浴冷却，并在搅拌下倒入冰水中，4°C 静置过夜析出黄色沉淀。抽滤收集固体，水洗后真空干燥，得到化合物 3（7.9 g，91.9%）。

（2）Cy7 的合成

在氮气保护下，将化合物 1（5.8 mg，22.0 mmol）、化合物 2（1.7 g，10.0 mmol）和乙酸钾（2.2 mg，22.0 mmol）溶于无水乙醇，于 70°C 回流反应 12 h。反应完成后，冷却至室温，并通过真空旋蒸法除去溶剂，得到绿色沉淀物。经 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ （20: 1, v/v）柱层析分离纯化，最终得到化合物 Cy7（4.46 mg，82%），为深绿色固体。 ^1H NMR（400 MHz，氘代氯仿） δ 8.36-8.36（d, 2H），7.40-7.34（m, 4H），7.25-7.20（m, 4H），6.51-6.48（d, 2H），4.37-4.35（t, 4H），4.07-4.04（t, 4H），2.83-2.80（t, H），2.09（s, 1H），1.97-1.94（t, 2H），1.73（s, 12H）。

1.3 H-MnO_2 的制备

(1) SiO_2 的合成。

首先，采用 stober 法合成单分散二氧化硅颗粒，作为中空二氧化锰的硬质模板。然后，向 25 mL 无水乙醇中加入 0.6 mL 去离子水和 1.8 mL 氨水，在室温下搅拌 10 min。继续取 0.9 μL TEOS 溶于 5 mL 无水乙醇中，并将其缓慢滴加入上述溶液中。将混合物升温至 40 $^\circ\text{C}$ ，搅拌回流过夜，得到 SiO_2 纳米球。所得产物用乙醇和水清洗反复清洗，保存在水中以备后续使用

(2) H-MnO_2 的合成。

在超声处理下，将含有 400 mg KMnO_4 的水溶液滴入 40 mg SiO_2 的溶液中，继续在超声环境下处理 8 h。得到 MnO_2 包覆的纳米粒子 $\text{SiO}_2@\text{MnO}_2$ ，所得产物用乙醇和水清洗反复清洗。最后，将 $\text{SiO}_2@\text{MnO}_2$ 分散到 20 mL NaCO_3 (2 M) 溶液中，60 $^\circ\text{C}$ 搅拌过夜，所得产物用乙醇和水清洗反复清洗，离心得到 H-MnO_2 纳米颗粒并分散在去离子水中。

1.4 $\text{Cy7}@\text{MnO}_2$ 的制备

将 2 mg Cy7 到 20 mL H-MnO_2 (10 mg) 溶液中并在室温下搅拌 24 h。通过离心获得 $\text{Cy7}@\text{MnO}_2$ 。样品多次离心以收集不同时间上清液，通过紫外可见分光光度计检测吸光度，计算上清液中 Cy7 的含量，用于测定 H-MnO_2 中 Cy7 的负载量。

1.5 $\text{Cy7}@\text{MnO}_2$ 的 H_2O_2 响应性降解

将 $\text{Cy7}@\text{MnO}_2$ ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 置于 pH=6.5、不同浓度 H_2O_2 (0、50、100、200、400 μM) 溶液中，孵育 15 min 后，测量不同样品的紫外吸收确定 $\text{Cy7}@\text{MnO}_2$ 的降解。

1.6 $\text{Cy7}@\text{MnO}_2$ 的 O_2 生成

将 $\text{Cy7}@\text{MnO}_2$ ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 分别置于不同 pH 值 (pH = 6.5 和 pH = 7.4)、有无 H_2O_2 (200 μM) 的溶液中孵育，使用氧气荧光探针 $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$ (RDPP) 测量不同实验组的荧光光谱。

2 实验结果与讨论

2.1 $\text{Cy7}@\text{MnO}_2$ 的表征与性能测试

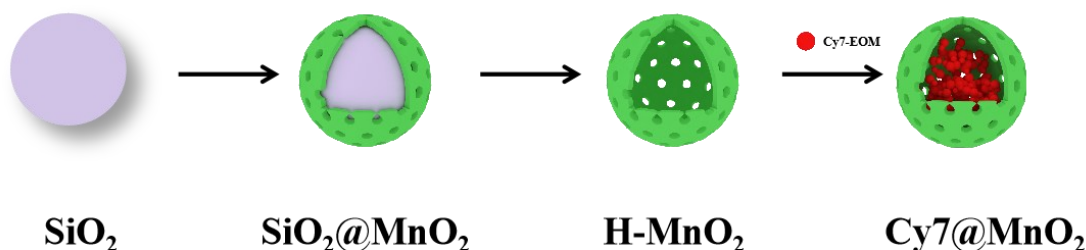
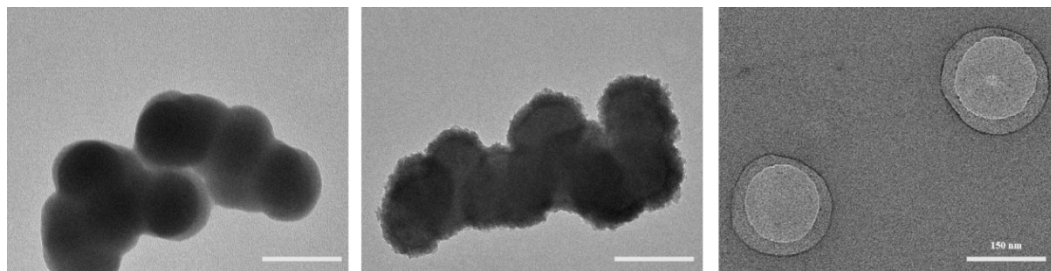


图 2 $\text{Cy7}@\text{MnO}_2$ 的合成流程示意图

如图 2 所示，首先使用 SiO_2 作为模板制备 H-MnO_2 。随后，将 H-MnO_2 与 Cy7 共搅拌得到纳米递送系统 $\text{Cy7}@\text{MnO}_2$ 。

图3 SiO₂、SiO₂@MnO₂和H-MnO₂的TEM图像

如图3所示,TEM结果显示,所制备的H-MnO₂纳米颗粒为分散均匀的空心壳结构,中空MnO₂赋予其高比表面积和大空腔,为药物负载提供了理想的空间结构。

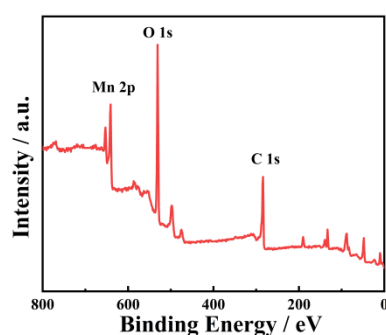
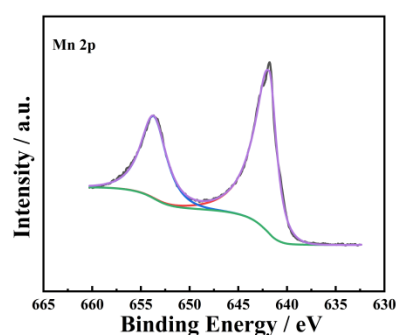
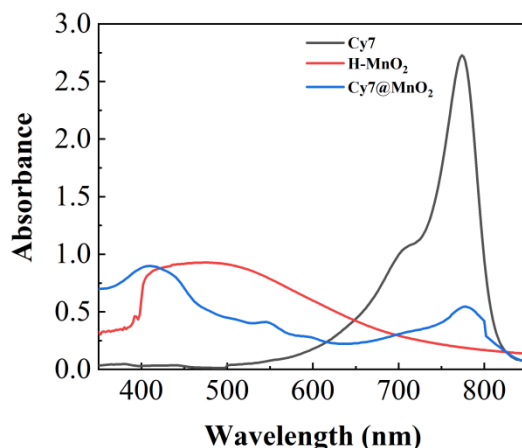
(a) H-MnO₂的XPS全扫描光谱(b) H-MnO₂的Mn 2p高分辨率XPS谱图

图4

如图4所示,X射线光电能谱(XPS)被用于表征H-MnO₂中的元素组成和化学状态。XPS扫描全谱结果证明该纳米壳主要由锰和氧元素组成。在高分辨Mn 2p轨道能谱中,观察到位于结合能642.1 eV和653.8 eV的特征双峰,其峰位差值为11.7 eV,且与四价锰(Mn⁴⁺)的标准特征峰位重叠,表明样品中的锰元素主要以+4价氧化态存在。

图5 Cy7@MnO₂的紫外-可见吸收光谱

如图 5 所示，使用紫外-可见吸收光谱对 Cy7@MnO₂ 进行表征。Cy7@MnO₂ 在 790 nm 和 400 nm 两处特征吸收峰大致对应于 Cy7 和 H-MnO₂ 的特征峰，证实了 Cy7 成功包覆在 Cy7@MnO₂ 上。

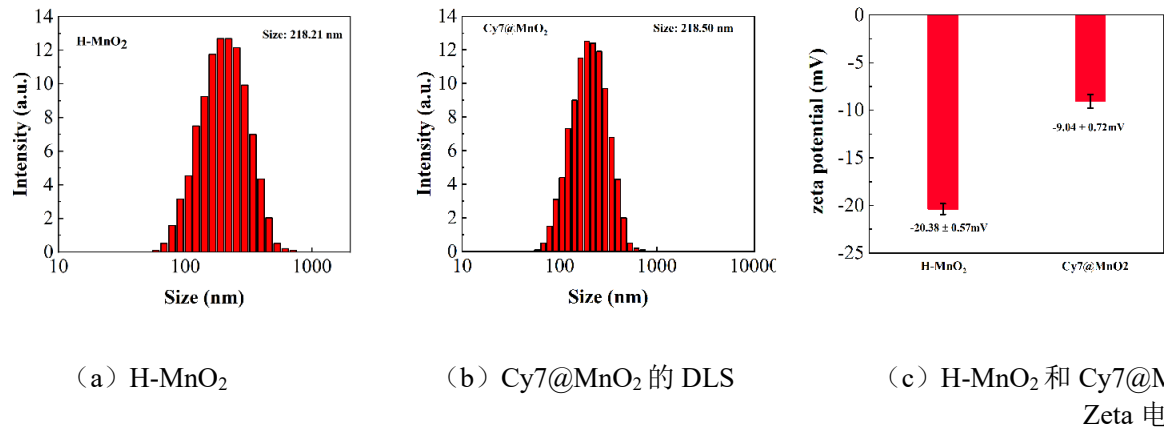
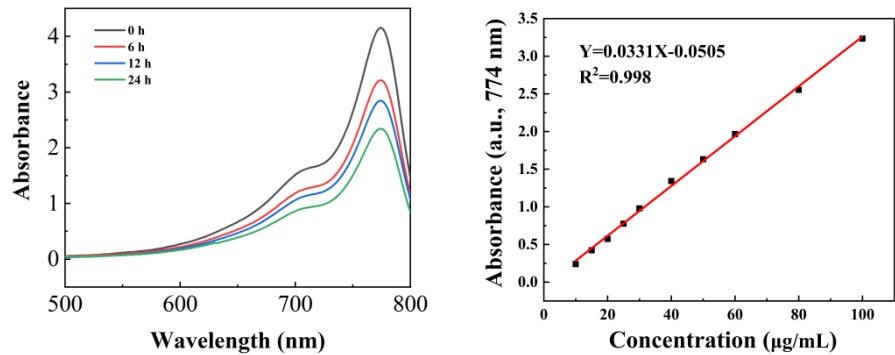


图 6

如图 6，通过 DLS 可知，H-MnO₂ 加载 Cy7-前后水动力直径基本不变。由于表面水合作用，与 TEM 相比略有增加。此外，H-MnO₂ 的 Zeta 电位为 -20.38 ± 0.57 mV，而 Cy7@MnO₂ 的 Zeta 电位为 -9.04 ± 0.72 mV。二者的差异性再次证明 Cy7@MnO₂ 的合成



(a) 制备 Cy7@MnO₂ 时上清液中的 Cy7 紫外吸收
图 7 (b) Cy7 的标准曲线

如图 7 所示，通过紫外-可见吸收光谱标准曲线法计算出 Cy7 的负载率为 8.62%，(Cy7: H-MnO₂, w/w)。

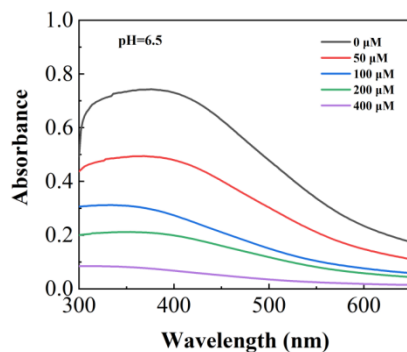


图8 Cy7@MnO₂与不同浓度H₂O₂（0、50、100、200、400 μM）孵育后的紫外-可见光谱

如图8所示,为研究Cy7@MnO₂在体外的响应裂解能力,将Cy7@MnO₂与不同浓度H₂O₂孵育,随着H₂O₂浓度增加,Cy7@MnO₂的紫外吸收逐渐降低,表明Cy7@MnO₂在H₂O₂下的响应性裂解。

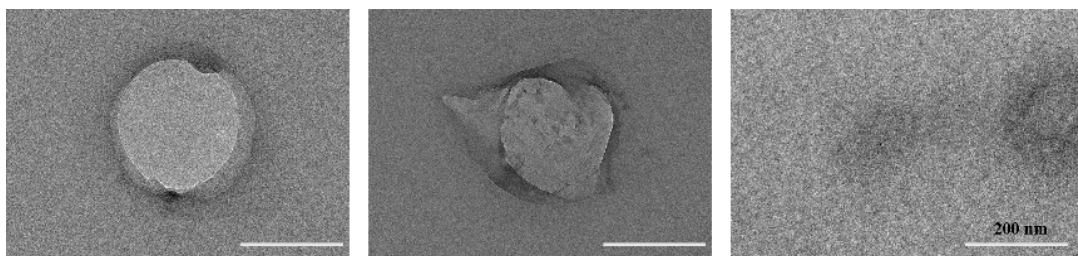


图9 Cy7@MnO₂与H₂O₂溶液（200 μM）孵育后的TEM图像（pH=6.5）

如图9所示,Cy7@MnO₂与200 μM H₂O₂孵育后结构破裂,在30 min内形状完全模糊,进一步表明Cy7@MnO₂在H₂O₂下的响应性裂解。

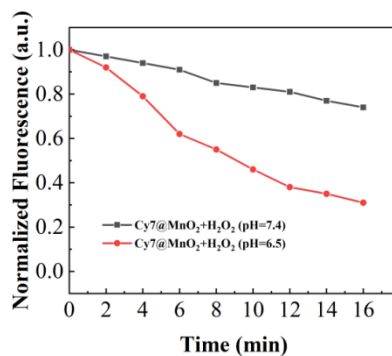
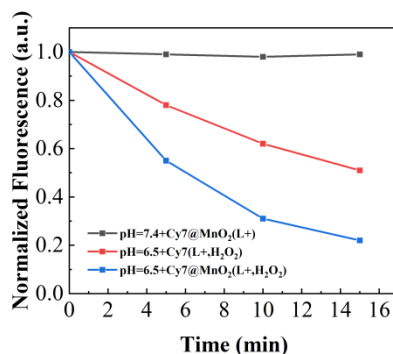


图10 通过RDPP探针检测不同条件下Cy7@MnO₂的O₂生成能力

如图10,O₂的持续供给是提升PDT效果的关键因素。采用猝灭型荧光探针[Ru(dpp)₃]₂Cl₂(RDPP)作为O₂探针,定量检测体系中的O₂生成量。实验结果显示,Cy7@MnO₂在中性条件(pH=7.4)下的氧气产率为26%,而在酸性环境(pH=6.5)中显著提升至77%。中性条件下的有限产氧主要来源于MnO₂对H₂O₂的催化分解作用,而酸性条件下则得益于MnO₂、H₂O₂与H⁺三者协同的化学反应,从而实现了高效的O₂生成。这充分证实了MnO₂在O₂生成过程中的关键作用。

图 11 使用 SOSG 探针检测不同条件下 Cy7@MnO₂ 的 ¹O₂ 生成能力

如图 11, 使用荧光探针 SOSG 评估 Cy7@MnO₂ 的 ¹O₂ 生成能力。实验结果显示, 在 808 nm 激光照射 (0.1W/cm²) 条件下, 中性环境 (pH=7.4) 中的 Cy7@MnO₂ 几乎不产生 ¹O₂, 充分证实了 MnO₂ 能够有效屏蔽 Cy7 的光毒性。同时, 在模拟肿瘤微环境条件下, 激光照射后的 Cy7@MnO₂ 系统产生的 ¹O₂ 显著高于游离 Cy7, 这一结果不仅验证了肿瘤微环境触发的药物释放机制, 更揭示了 Cy7@MnO₂ 体系在促进 ¹O₂ 生成方面的优越性能。

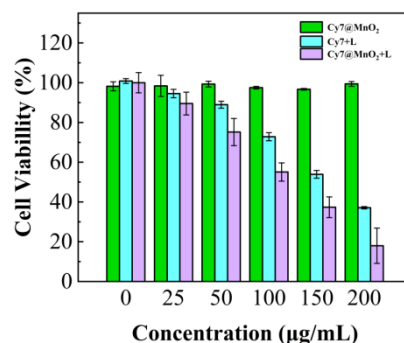


图 12 不同处理组 4T1 细胞的存活率

如图 12, 通过 MTT 实验系统评估了 Cy7@MnO₂ 纳米药物对 4T1 细胞的抗肿瘤作用。结果显示, 在 808 nm 激光 (L) 照射下, Cy7@MnO₂+L 组表现出显著的协同治疗效果: 当浓度为 200 μg/mL 时, 细胞存活率降至 18%, 杀伤效率显著高于较游离 Cy7 组。而未光照的 Cy7@MnO₂ 组则保持高细胞存活率 (>90%), 证实了该体系的"光控激活"特异性。

3 结论

本研究成功构建了一种基于中空 MnO₂ 纳米载体的智能递送系统 (Cy7@MnO₂), 该系统通过肿瘤微环境特异性响应实现了光敏剂 Cy7 的精准控释与激活。实验结果表明: 在生理条件下 (pH 7.4), MnO₂ 外壳可有效屏蔽 Cy7 的光敏活性, 显著降低系统毒性; 而在模拟肿瘤微环境中, 高浓度 H₂O₂ 触发 MnO₂ 分解并释放 Cy7, 同时产生的 O₂ 有效缓解了肿瘤缺氧。值得注意的是, 近红外激光照射 (808 nm) 可精确激活释放的 Cy7 产生大量 ¹O₂, 其产量显著高于游离 Cy7。这种"微环境响应+光控激活"的双重调控策略不仅实现了治疗过程的时空精准控制, 更通过氧气供给与光动力治疗的协同作用显著提升了抗肿瘤效果, 为开发新型肿瘤靶向治疗系统提供了重要参考。

参考文献

- [1] LIN J, SONG T, LIU Z, et al. Effects of biodegradable biomedical porous MnO₂ nanoparticles on blood components and functions[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2022, 217: 112667.
- [2] CHEN G, YAN S, OUYANG C, et al. A new hydrogel to promote healing of bacteria infected wounds: Enzyme-like catalytic activity based on MnO₂ nanocrystal[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 470: 143986.
- [3] ZHOU Z H, LIANG S Y, ZHAO T C, et al. Overcoming chemotherapy resistance using pH-sensitive hollow MnO₂ nanoshells that target the hypoxic tumor microenvironment of metastasized oral squamous cell carcinoma[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 157.
- [4] CHEN W, HU F, GAO Q, et al. Tumor acidification and GSH depletion by bimetallic composite nanoparticles for enhanced chemodynamic therapy of TNBC[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 98.
- [5] LIANG K, SUN H, YANG Z, et al. Breaking the redox homeostasis: an albumin-based multifunctional nanoagent for GSH depletion-assisted chemo-/chemodynamic combination therapy[J]. Advanced Functional Materials, 2021, 31(22): 2100355.
- [6] ZHU W, DONG Z, FU T, et al. Modulation of hypoxia in solid tumor microenvironment with MnO₂ nanoparticles to enhance photodynamic therapy[J]. Advanced Functional Materials, 2016, 26(30): 5490-5498.
- [7] FAN Y, SHI J, ZHANG R, et al. Tumor microenvironment-activated and near-infrared light-driven free radicals amplifier for tetra-modal cancer imaging and synergistic treatment[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2025, 689: 137208.
- [8] ZHU X, WANG M, WANG H, et al. Multifunctional hollow MnO₂@porphyrin@bromelain nanoplatform for enhanced photodynamic therapy[J]. Small, 2022, 18(52): 2204951.
- [9] ZHANG M, LIU X, LUO Q, et al. Tumor environment responsive degradable CuS@mSiO₂@MnO₂/DOX for MRI guided synergistic chemo-photothermal therapy and chemodynamic therapy[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 389: 124450.
- [10] JIN Z, WANG Y, HAN M, et al. Tumor microenvironment-responsive size-changeable and biodegradable HA-CuS/MnO₂ nanosheets for MR imaging and synergistic chemodynamic therapy/phototherapy[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2024, 238: 113921.
- [11] JIANG R, HANG L, LI W, et al. Tri-stimulus-responsive hollow mesoporous MnO₂ nanocarriers for magnetic-resonance-imaging-guided synergistic starvation/photodynamic therapy of breast cancer[J]. ACS Applied Nano Materials, 2024, 7(1): 1450-1461.
- [12] YIN Z, JI Q, WU D, et al. H₂O₂-responsive gold nanoclusters @ mesoporous silica @ manganese dioxide nanozyme for “off/on” modulation and enhancement of magnetic resonance imaging and photodynamic therapy[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021, 13(13): 14928-14937.
- [13] LIAO Y, LIANG Y, HUANG Y, et al. Heptamethine cyanines in bioorthogonal chemistry[J]. Chinese Chemical Letters, 2024, 35(2): 109092.
- [14] TANG X, YANG X, WANG Y, et al. Lysosomal-targeted near-infrared phototherapy agent with type-I photodynamic activity for high-performance synergistic therapy under hypoxia[J]. Surfaces and Interfaces, 2025, 62: 106075.
- [15] HUANG F, LI Y, LIU J, et al. Intraperitoneal injection of cyanine-based nanomicelles for enhanced near-infrared fluorescence imaging and surgical navigation in abdominal tumors[J]. ACS Applied Bio Materials, 2021, 4(7): 5695-5706.
- [16] OUYANG F, ZHAO L, SHUAI Q. Photothermally driven degradable nanomissile for single-wavelength phototherapy and hypoxia-activated chemotherapy[J]. Inorganic Chemistry Communications, 2023, 157: 111310.
- [17] WANG Y, XU S, SHI L, et al. Cancer-cell-activated in situ synthesis of mitochondria-targeting AIE photosensitizer for precise photodynamic therapy[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(27): 14945-14953.
- [18] KONG H, TANG Y, HAO X, et al. Self-assembly of H₂S-generating photosensitizer for gas-assisted synergistic photothermal therapy[J]. Small, 2025, 21(13): 2411242.
- [19] HOU Y, LI J, JIANG G, et al. Synergistic inter- and intramolecular aggregation of dimeric cyanine dyes affords highly efficient in vivo self-delivery and photothermal therapy[J]. Advanced Functional Materials, 2024, 34(32): 2316452.
- [20] ZHANG X, LIANG X, MA X, et al. Highly stable near-infrared dye conjugated cerasomes for fluorescence imaging-guided synergistic chemo-photothermal therapy of colorectal cancer[J]. Biomaterials Science, 2019, 7(7): 2873-2888.