

· 论著 ·

硫化铜纳米粒的处方工艺优化与体外评价

陈珍珍^{1,2}, 陶 春¹, 张雪婷^{1,2}, 周桂芝^{1,3}, 张 倩², 宋洪涛¹ (1. 福建医科大学福总临床医学院/第九〇〇医院, 福建 福州 350001; 2. 福建医科大学药学院, 福建 福州 350108; 3. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108)

【摘要】 目的 为避免硫化铜(CuS)纳米粒体内蓄积, 制备并优化 CuS 纳米粒, 分析粒径影响因素并评价其光热性能。**方法** 在单因素考察基础上, 采用星点设计-响应面法进一步分析各因素对 CuS 纳米粒粒径的影响, 获得最佳处方工艺。考察优选的纳米粒的理化性质, 包括形态、粒径稳定性、光热转换性能及光热稳定性。采用 CCK-8 法评价 CuS 纳米粒对 4T1 乳腺癌细胞以及 HK2 肾细胞的毒性, 并考察其光热效应对 4T1 乳腺癌细胞的杀伤效果。**结果** CuS 纳米粒优选处方工艺的水合粒径为(10.53±1.63)nm; 透射电镜下显示其粒径为(3.10±0.81)nm; 所优选的 CuS 纳米粒具有良好的粒径稳定性, 良好的光热转换性能与光热稳定性。细胞毒研究显示, 所优选的 CuS 纳米粒分别在 100 μg/ml 及 150 μg/ml 浓度范围内, 对 4T1 乳腺癌细胞以及 HK2 肾细胞均无显著的细胞毒性, 且其对 4T1 乳腺癌细胞具有显著的光热杀伤效果。**结论** 所制备的 CuS 纳米粒实际粒径小于 6 nm 且具有良好的光热效应, 有望解决 CuS 纳米粒体内蓄积的问题, 使其更好地应用于抗肿瘤治疗。

【关键词】 硫化铜纳米粒; 单因素考察; 星点设计-响应面法; 光热性能

【中图分类号】 R943

【文献标志码】 A

【文章编号】 1006-0111(2020)04-0328-06

【DOI】 10.12206/j.issn.1006-0111.201912092

Optimization of formulation process and *in vitro* evaluation of copper sulfide nanoparticles

CHEN Zhenzhen^{1,2}, TAO Chun¹, ZHANG Xueting^{1,2}, ZHOU Guizhi^{1,3}, ZHANG Qian², SONG Hongtao¹ (1. Fuzong Clinical Medical College of Fujian Medical University/No. 900 Hospital, Fuzhou 350001, China; 2. School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China; 3. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

【Abstract】 Objective To avoid the accumulation of copper sulfide (CuS) nanoparticles, prepare and optimize CuS nanoparticles, analyze the factors affecting the particle size and evaluate their photothermal properties. **Methods** Based on the single factor study, central composite design-response surface methodology was used to optimize the CuS nanoparticle formulation process. The morphology, particle size stability, photothermal conversion efficiency, photothermal stability of optimized CuS nanoparticles were characterized. The toxicity of CuS nanoparticles on 4T1 breast cancer cells and HK2 kidney cells was evaluated by CCK-8 method. *In vitro* photothermal experiment was used to investigate the ability of CuS nanoparticles on killing 4T1 breast cancer cells. **Results** The average hydration dynamic diameter of optimized CuS nanoparticles was (10.53±1.63)nm, the actual particle size of CuS nanoparticles showed by TEM image was (3.10±0.81)nm. It had good particle size stability, good photothermal conversion efficiency and photothermal stability. Within the concentration range of 100 μg/ml and 150 μg/ml, it showed no significant toxicity on 4T1 breast cancer cells and HK2 kidney cells, indicating the good stability of CuS nanoparticles. *In vitro* photothermal therapy showed that CuS nanoparticles had good ability to kill 4T1 breast cancer cells by photothermal. **Conclusion** The prepared CuS nanoparticles have a small particle size (less than 6nm) and a good photothermal effect, which is expected to solve the problem of CuS nanoparticles accumulation *in vivo* and make it better for tumor treatment.

【Key words】 copper sulfide nanoparticles; single factor study; central composite design-response surface methodology; photothermal effect

【基金项目】 福建省自然科学基金项目资助(2017J01822)

【作者简介】 陈珍珍, 硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型与制剂新技术, Email: 673205814@qq.com

【通讯作者】 张 倩, 硕士, 副教授, 研究方向: 药剂学, Email: 1009467948@qq.com; 宋洪涛, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药物新剂型与制剂新技术, Email: sohoto@vip.163.com

光热疗法 (photothermal therapy, PTT) 是近年来新兴的肿瘤治疗技术, 相比传统的手术治疗、化疗和放疗, 具有更小的副作用^[1-4]。PTT 包含 2 个要素, 即近红外光和光敏剂。近红外光具有较强的组织穿透能力^[5-6], 照射后肿瘤组织中的光敏剂可将光能转换为热能, 当温度达到 42 °C 以上时, 可导致肿瘤细胞的凋亡或坏死^[7]。

硫化铜 (CuS) 纳米粒是一种优良的光敏剂。相比广泛研究的金纳米粒, CuS 纳米粒具有制备成本低的优点, 特别是其具有稳定的光热效应。CuS 纳米粒的近红外吸收主要源于 Cu²⁺ 的 d-d 能级跃迁, 因而其光热效应不受粒径、形状和生理环境的影响, 可在肿瘤组织中维持稳定的光热效应^[8]。CuS 纳米粒具有良好的生物相容性, 细胞毒性较低, 但与其他多数无机或金属纳米粒同样存在体内发生蓄积的风险, 长期使用的安全性未知。肾脏是处理纳米粒的主要器官之一, 报道显示, 直径小于 6 nm 的纳米粒可被肾脏滤过, 从而使大部分纳米粒经尿液排出体外^[9-10]。

因此, 本文拟制备粒径小于 6 nm 的 CuS 纳米粒, 通过深入分析各因素, 获得最优的处方工艺, 进一步通过光热曲线和细胞实验进行体外评价。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Litesizer500 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪 (奥地利 Anton Paar 公司); JEOL 2010 透射电子显微镜 (日本电子株式会社); MDL-H-980-5W 上转换发光用激光器 (长春新产业光电技术有限公司); RX-300 红外热成像仪 (广东省东莞市不凡电子有限公司); NVMT SPARTAN 夜视仪 (梅越电子商务有限公司); DV215CD 精密分析天平 (美国 Ohaus Discovery 公司); HWS 26 电热恒温水浴锅 (上海一恒科学仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限责任公司); H1850R 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 明澈-D24UV 纯水/超纯水一体化系统 (德国 Merck Millipore 公司)

1.2 材料

二水合氯化铜 (CuCl₂·2H₂O)、九水合硫化钠 (Na₂S·9H₂O) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 聚维酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP, MW=10 000, 默克生命科学有限公司); 细胞增殖及毒性检测试剂盒 (CCK-8, 北京索莱宝生物技术有限公司); RPMI1640 培养液, DMEM 不完全高糖培养

液, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) (江苏凯基生物技术有限公司); 透析袋 (MWCO 14000, 美国 Viskase 公司); 去离子水 (实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 硫化铜纳米粒的制备

参考文献确定 CuS 纳米粒基本处方^[11]: 取 100 μl CuCl₂ 溶液 (300 mmol/L) 加入 10 ml PVP 溶液 (100 mg/ml) 中, 再加入 30 μl Na₂S 溶液 (1 mol/L), 室温磁力搅拌 5 min 后, 转入 90 °C 水浴继续磁力搅拌 15 min, 测定其粒径和多分散指数 (polydispersity index, PDI)。

2.2 单因素考察

考察搅拌时间、水浴温度、水浴时间、PVP 浓度、CuCl₂ 与 Na₂S 摩尔比 (Cu:S) 对 CuS 纳米粒粒径和 PDI 的影响。

表 1 结果显示, 搅拌时间越长, 水浴温度越低, Cu:S 越小, 则 CuS 纳米粒粒径呈减小趋势。水浴时间越长, PVP 浓度越大, 粒径显示了先增大后减小的趋势。综合各因素不同水平对应的纳米粒粒径, 发现水浴温度、PVP 浓度和 Cu:S 易产生较大的粒径波动, 表明其可能是影响 CuS 纳米粒粒径的主要因素。另外, 各因素不同水平对 PDI 的影响均不显著。因此, 根据单因素考察结果, 确定搅拌时

表 1 CuS 纳米粒单因素考察结果 (n=3)

因子	水平	粒子大小 (nm)	多分散指数
搅拌时间 (min)	3	18.13±5.42	0.27±0.01
	5	16.12±1.29	0.27±0.01
	7	15.40±1.86	0.26±0.01
水浴温度 (°C)	80	14.61±4.35	0.27±0.01
	90	16.12±1.29	0.27±0.01
	100	22.85±1.71	0.26±0.01
水浴时间 (min)	10	18.12±6.31	0.25±0.02
	15	16.12±1.29	0.27±0.01
	20	21.30±5.71	0.24±0.01
PVP 浓度 (mg/ml)	80	25.56±4.40	0.27±0.01
	100	16.12±1.29	0.27±0.01
	120	20.72±3.38	0.25±0.02
Cu:S	3:1	15.08±2.92	0.26±0.01
	2:1	20.25±1.16	0.27±0.01
	1:1	16.12±1.29	0.27±0.01
	1:2	11.34±3.08	0.25±0.02
	1:3	11.27±2.88	0.25±0.02

间为 5 min, 水浴时间为 15 min, 以粒径为评价指标, 采用星点设计-响应面法进一步优化水浴温度、PVP 浓度、Cu:S 三个因素。

2.3 星点设计-响应面法优化 CuS 纳米粒处方工艺

在单因素考察的基础上, 采用中心复合响应面设计(central composite design, CCD), 选择上述筛选出的三个因素: 水浴温度(X1)、PVP 浓度(X2)、Cu:S(X3)为考察因素, 粒径(Y1)为评价指标, 进行三因素五水平的星点设计。

2.3.1 星点设计结果

星点实验设计的因素、水平及代码值如表 2 所示, 实验设计与结果如表 3 所示。

表 2 星点设计因素和水平

因子	水平				
	-1.682	-1	0	+1	+1.682
X1 (°C)	60.00	70	85	100	110.20
X2 (mg/ml)	66.36	80	100	120	133.64
X3	0.25	0.33	1.67	3	4

表 3 星点设计实验安排表和结果 (n=3)

序号	X1 (°C)	X2 (mg/ml)	X3	Y1 (nm)
1	-1	-1	-1	13.04
2	+1	-1	-1	14.23
3	-1	+1	-1	14.48
4	+1	+1	-1	13.39
5	-1	-1	+1	24.37
6	+1	-1	+1	27.30
7	-1	+1	+1	18.62
8	+1	+1	+1	20.73
9	-1.682	0	0	18.87
10	+1.682	0	0	15.62
11	0	-1.682	0	24.01
12	0	+1.682	0	17.06
13	0	0	-1.682	13.92
14	0	0	+1.682	15.11
15	0	0	0	18.81
16	0	0	0	16.84
17	0	0	0	16.14
18	0	0	0	17.89
19	0	0	0	16.20
20	0	0	0	16.30

2.3.2 模型拟合

采用 Design expert 8.0.6, 将各影响因素(X1、

X2、X3)和评价指标(Y1)进行二次多项式模型拟合, 方程如下:

$$Y1=4.15-0.0086X1-0.18X2+0.42X3-0.045X1X2+0.064X1X3-0.17X2X3+0.043X1^2+0.17X2^2-0.22X3^2$$

此时二项式模型达显著水平 ($P=0.0065$), $r=0.9129$, 说明该方程与实际情况拟合度良好。

2.3.3 响应面优化及预测性评价

根据表 3 结果, 绘制水浴温度(X1)、PVP 浓度(X2)及 Cu:S(X3)对粒径(Y1)的响应面。

根据图 1 的数据进行分析, 确定最优参数为: 水浴温度 100 °C, PVP 浓度为 100 mg/ml, Cu : S 为 1 : 3。按照最优处方工艺平行制备 3 份样品, 粒径分别为 9.37、12.39、9.84 nm, 平均值为 (10.53±1.63)nm, 预测值为 10.86 nm, 根据公式: 偏差=(预测值-实际值)/预测值×100%, 得出实际值与预测值的偏差为 3.04%, 说明建立的数学模型较为可靠, 预测性良好。

2.4 CuS 纳米粒的体外评价

2.4.1 纳米粒形态

取 CuS 纳米粒适量, 加去离子水稀释 10 倍, 取 5 μl 稀释后的 CuS 纳米粒, 滴于缚有碳支持膜的铜网上, 铜网下铺滤纸, 用于吸去多余的液体。自然晾干后, 用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察纳米粒形态。图 2 结果显示, CuS 纳米粒形态圆整, 分散性良好, 经 Image J 软件测量, 平均粒径为(3.10±0.81)nm。

2.4.2 粒径稳定性

将 CuS 纳米粒分别放置在 4 °C 与 25 °C 条件下, 定时测定粒径。经统计发现, 20 d 内 CuS 纳米粒的粒径变化没有明显差异, 说明所制的 CuS 纳米粒具有良好的粒径稳定性(图 3)。

2.4.3 光热效应

(1)近红外光功率密度: 考察 CuS 纳米粒浓度为 50 μg/ml 条件下, 不同近红外光功率密度(0.5、1、1.5、2 W/cm²)对 CuS 纳米粒光热效应的影响。采用 980 nm 的近红外激光器, 红外热成像仪每隔 30 s 记录温度, 记录 10 min, 平行测量 3 组, 绘制升温曲线, 同时, 以水在相同条件下做对照。随着功率密度增大, CuS 纳米粒升温加快(图 4), 而在相同条件下, 去离子水的升温速率显著低于 CuS 纳米粒(图 5)。

(2)CuS 纳米粒浓度: 考察在 1 W/cm² 功率密度下, CuS 纳米粒不同浓度(25、50、150、200 μg/ml)对其光热效应的影响, 并以去离子水为空白对照。采用 980 nm 的近红外激光器, 红外热成像仪每隔

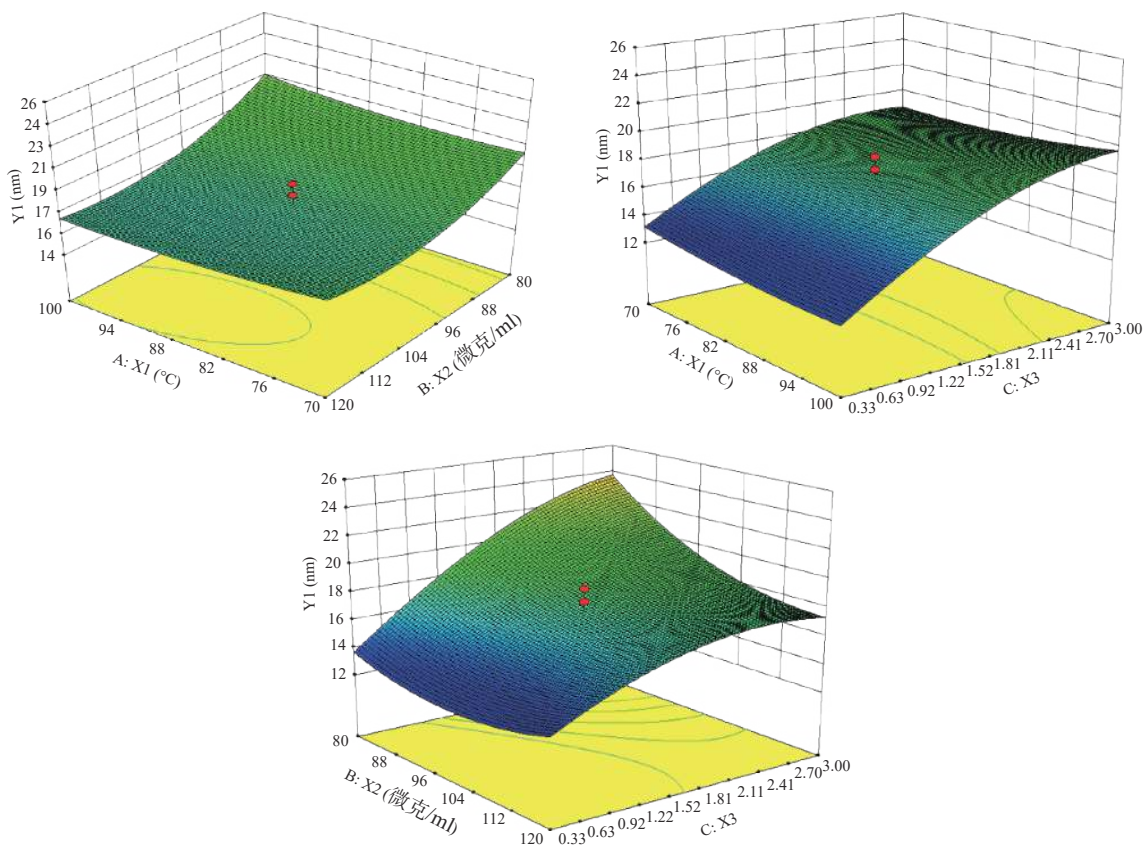


图 1 温度 (X1)、PVP 浓度 (X2)、Cu:S (X3) 对粒径值 (Y1) 的三维响应面图

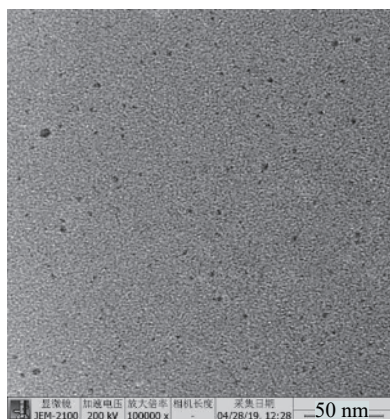


图 2 CuS 纳米粒 TEM 图

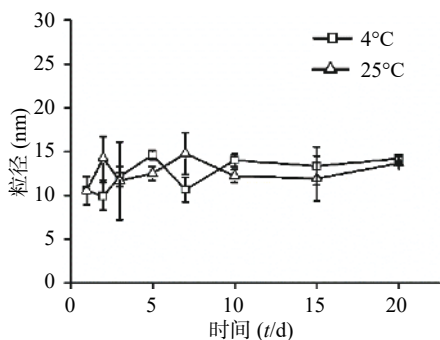


图 3 CuS 纳米粒分别在 4 °C 与 25 °C 下的粒径变化曲线 ($n=3$)

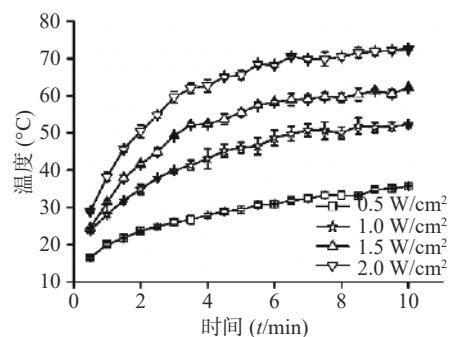


图 4 CuS 纳米粒在不同功率密度下的升温曲线 ($n=3$)

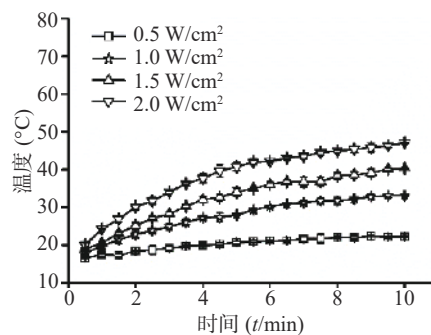
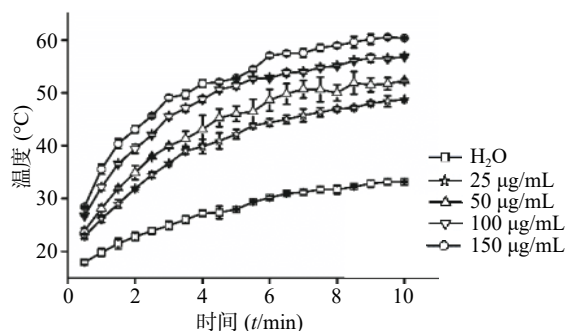


图 5 水在不同功率密度下的升温曲线 ($n=3$)

30 s 记录温度, 记录 10 min, 平行 3 组, 绘制升温曲线。结果显示, 在相同功率密度条件下, CuS 纳米粒浓度越大, 升温速率越大(图 6)。

图 6 CuS 纳米粒在不同浓度下的升温曲线 ($n=3$)

2.4.4 光热稳定性

采用 980 nm 近红外激光器,选取 CuS 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,激光功率密度为 $1\text{ W}/\text{cm}^2$,将激光器“开启-关闭”4 个循环,即照射 10 min 后停止,温度恢复至室温后再次开启照射。如图 7 所示,CuS 纳米粒经近红外光照射 4 个循环的温度变化曲线基本一致,即反复照射不影响 CuS 纳米粒的光热效应,表明其具有良好的光热稳定性。

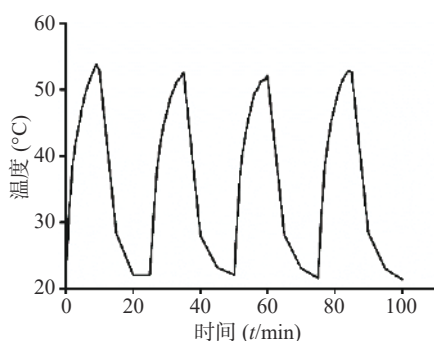


图 7 CuS 纳米粒经近红外光照射 4 个周期的温度曲线

2.5 体外细胞实验

2.5.1 细胞毒性实验

考察 CuS 纳米粒对正常人肾小管上皮细胞 (HK2) 以及乳腺癌细胞 (4T1) 的毒性。实验前,取适量 CuS 纳米粒放入透析袋 (MWCO=14000) 中,

透析 24 h 以除去杂质。取对数生长期细胞,调整 HK2 细胞浓度为 $1 \times 10^5\text{ cells}/\text{mL}$,4T1 细胞浓度为 $5 \times 10^4\text{ cells}/\text{mL}$,将 100 μL /孔的细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板,置于 37°C ,5% CO_2 培养箱中。孵育 24 h 后,每孔加入 10 μL 不同浓度的 CuS 纳米粒,使终浓度分别为 3.1、6.3、12.5、25、50、100、150 及 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,继续培养 24 h 后,去除 96 孔板中培养基,加 PBS 洗涤 2 次 (以排除 Cu^{2+} 对 CCK-8 试剂的影响),每孔加入 100 μL 培养基及 10 μL CCK-8 试剂,于培养箱中孵育 4 h 后,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值 (A)。参照公式:

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{(A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}})}{(A_0 - A_{\text{空白}})} \times 100\%$$

计算细胞活力百分率,其中 $A_{\text{加药}}$ 指具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度, $A_{\text{空白}}$ 指具有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度, A_0 指具有细胞、CCK-8 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度。

结果显示 (图 8),CuS 纳米粒分别在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,对 4T1 乳腺癌细胞以及 HK2 肾细胞均无显著的细胞毒性 (细胞活力大于 80%),表明 CuS 纳米粒具备良好的生物相容性。

2.5.2 光热效应对肿瘤细胞的杀伤作用

考察 CuS 纳米粒的光热效应对 4T1 细胞的杀伤作用。取对数生长期细胞,调整 4T1 细胞浓度为 $5 \times 10^4\text{ cells}/\text{mL}$,将 200 μL /孔细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板,置于 37°C ,5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,去除全部培养基,加入 200 μL 含 CuS 纳米粒的培养基 (CuS 纳米粒的浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。采用 $1\text{ W}/\text{cm}^2$ 的近红外光,照射不同时间 (0、1、3、5、7、10 min),随后采用 CCK-8 试剂测定细胞活力百分率,参照“2.5.1”项下公式计算。结果显示 (图 9),近红外光照射 1 min 对 4T1 细胞的活力无明显影

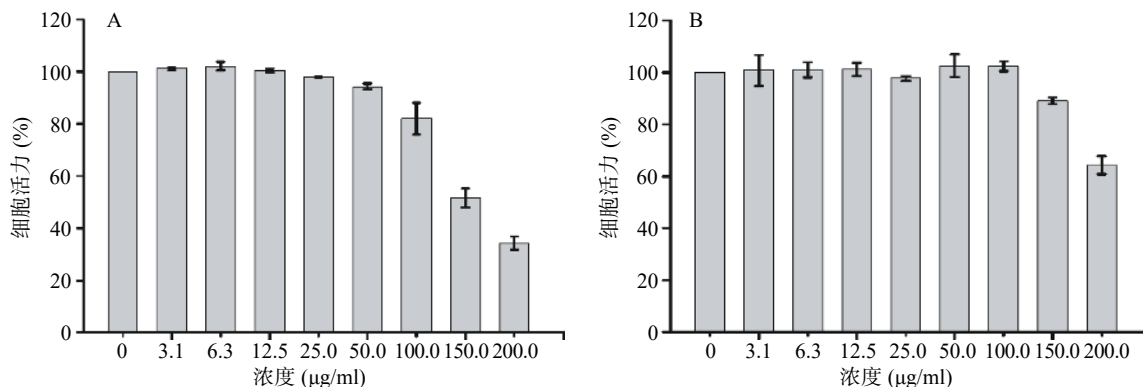


图 8 CuS 纳米粒浓度对细胞活力影响

A. 细胞; B. HK2 细胞 ($n=5$)

响,继续延长照射时间,细胞活力呈显著的降低趋势,照射 10 min 后的细胞活力仅为 28.76 %。

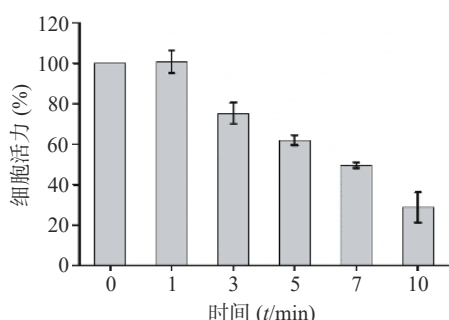


图 9 CuS 纳米粒光热效应作用下的 4T1 乳腺癌细胞的存活率 ($n=5$)

采用与上述相同的方法,改为 6 孔板,经 980 nm 近红外光(1 W/cm^2)照射 10 min 后,加入 0.2 % 台盼蓝对死细胞进行染色(2 min)。去除染液并用 PBS 清洗 2 遍后,在倒置相差显微镜下进行观察。如图 10 所示,激光照射区域,细胞被染为蓝绿色,且显示了明显的边界,而对照组不加 CuS 纳米粒,仅给予近红外光照射,只有个别零散的细胞着色。图 9 与图 10 结果均表明 CuS 纳米粒对肿瘤细胞具有显著的光热杀伤效果。

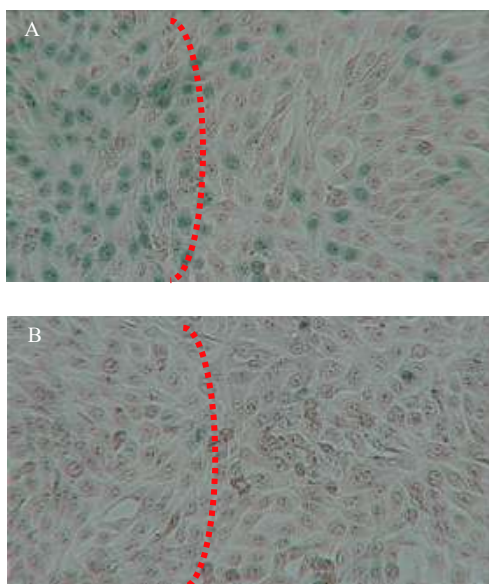


图 10 4T1 乳腺癌细胞光热杀伤台盼蓝染色图片
A. 含 CuS 纳米粒激光照射图; B. 单纯激光照射图;
红线左侧为激光照射区域

3 讨论

目前光热治疗作为新型的肿瘤治疗技术,寻找合适的光敏剂是亟待解决的重要问题。光热稳定、价格低廉等是 CuS 纳米粒的主要优点,但目前文献

所报道的 CuS 纳米粒粒径多在 10 nm 以上^[12-13],可能引起 CuS 纳米粒在体内的蓄积,将限制其在临床上的使用,而减小粒径可以有效解决这个问题。本研究经单因素考察和星点设计-响应面优化法,得到 CuS 纳米粒的最优处方工艺,成功制备实际粒径为 $(3.10 \pm 0.81) \text{ nm}$ 的 CuS 纳米粒,且制备方法简单,易于工业化生产。该处方中以 PVP 作为保护剂,使 CuS 纳米粒具有良好的粒径稳定性,分散度高,不易发生聚集沉淀,单因素考察分析也可发现 PVP 浓度对 CuS 纳米粒粒径具有较大影响, PVP 浓度低, CuS 纳米粒容易发生聚集,粒径增大;浓度太高,保护层过厚,也会引起 CuS 纳米粒粒径增大,因此选择合适的 PVP 浓度,是控制 CuS 纳米粒粒径关键因素之一。

由于 CuS 纳米粒在近红外区域(700~1 400)nm 具有强吸收,使其在近红外光照射下,具有较强的光热效应,所优选的 CuS 纳米粒在 1 W/cm^2 的激光功率密度下,照射 4 min,温度即可达到 42°C 以上,可引起肿瘤细胞的凋亡或坏死^[14]。因 CuS 纳米粒的光热转换性能来源于 Cu^{2+} 的 d-d 能级跃迁,不易受外界环境的影响,所优选的 CuS 纳米粒具有良好的光热稳定性。本实验所优选的 CuS 纳米粒生物相容性好,且对肿瘤细胞具有显著的光热杀伤作用,这与多数文献报道相一致^[15-16]。

综上,本研究所制备的 CuS 纳米粒粒径有望解决 CuS 纳米粒体内蓄积的问题,使其更好地应用于肿瘤光热治疗。本课题将进一步研究所制硫化铜纳米粒在体内的代谢情况以及对肿瘤组织的光热杀伤效果。

【参考文献】

- [1] YANG J C, SHANG Y, LI Y H, et al. An "all-in-one" antitumor and anti-recurrence/metastasis nanomedicine with multi-drug co-loading and burst drug release for multi-modality therapy[J]. *Chem Sci*, 2018, 9(36): 7210-7217.
- [2] YANG W T, GUO W S, LE W J, et al. Albumin-bioinspired Gd: CuS nanotheranostic agent for *in vivo* photoacoustic/magnetic resonance imaging-guided tumor-targeted photothermal therapy[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(11): 10245-10257.
- [3] LIN X D, FANG Y, TAO Z H, et al. Tumor-microenvironment-induced all-in-one nanoplatfor for multimodal imaging-guided chemical and photothermal therapy of cancer[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(28): 25043-25053.
- [4] LI W T, PENG J R, TAN L W, et al. Mild photothermal therapy/photodynamic therapy/chemotherapy of breast cancer by Lyp-1 modified Docetaxel/IR820 Co-loaded micelles[J]. *Biomaterials*, 2016, 106: 119-133.

(下转第 345 页)

- 161.
- [6] FLEMING R H, MCCORMACK H A, MCTEIR L, et al. Effects of dietary particulate limestone, vitamin K3 and fluoride and photostimulation on skeletal morphology and osteoporosis in laying hens[J]. *Br Poult Sci*, 2003, 44(5): 683-689.
- [7] 周建烈, 陈杰鹏, 段丽丽, 等. 维生素K₂(MK-7)防治骨质疏松的作用机制研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(4): 539-545.
- [8] WU W J, GAO H Y, JIN J S, et al. A comparatively study of menaquinone-7 isolated from Cheonggukjang with vitamin K1 and menaquinone-4 on osteoblastic cells differentiation and mineralization[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 131: 110540.
- [9] WU W J, KIM M S, AHN B Y. The inhibitory effect of vitamin K on RANKL-induced osteoclast differentiation and bone resorption[J]. *Food Funct*, 2015, 6(10): 3351-3358.
- [10] 庄焕雄, 陈东峰, 徐孟凡, 等. 维生素K₂对绝经后骨质疏松症的防治作用及血清组织蛋白酶K影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(5): 627-630.
- [11] 蒋益萍, 吴岩斌, 秦路平, 等. 墨旱莲组分中组织蛋白酶K非活性位点抑制剂研究[J]. *药科学报*, 2017, 52(6): 936-942.
- [12] 张乃丹, 蒋益萍, 薛黎明, 等. 仙茅酚苷类成分促进成骨细胞骨形成和抑制破骨细胞骨吸收[J]. *第二军医大学学报*, 2016, 37(5): 562-568.
- [13] 秦路平, 蒋益萍, 薛黎明, 等. 防治骨质疏松的中药制剂及其制备方法: 201210359162.5[P]. 2012-09-17.
- [14] 袁婷婷. 仙茅苷对骨细胞雌激素受体表达的影响及其初步药代动力学研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2014.
- [15] 邹志强, 符诗聪, 刘忠厚. 维生素K₂的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11(3): 389-392.
- [16] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 糖皮质激素性骨质疏松症诊疗指南(讨论稿)[J]. *中华全科医师杂志*, 2006, 5(8): 460-461.
- [收稿日期] 2020-01-17 [修回日期] 2020-04-13
[本文编辑] 李睿旻

(上接第333页)

- [5] ZHANG Z J, WANG J, CHEN C Y. Near-infrared light-mediated nanoplatforms for cancer thermo-chemotherapy and optical imaging[J]. *Adv Mater*, 2013, 25(28): 3869-3880.
- [6] LIAO J, LI W, PENG J, et al. Combined cancer photothermal-chemotherapy based on doxorubicin/gold nanorod-loaded polymersomes[J]. *Theranostics*, 2015, 5(4): 345-366.
- [7] WANG Y, HUANG X, TANG Y, et al. A light-induced nitric oxide controllable release nano-platform based on diketopyrrolopyrrole derivatives for pH-responsive photodynamic/photothermal synergistic cancer therapy[J]. *Chemical science*, 2018, 9(42): 8103-8109.
- [8] LI Y, LU W, HUANG Q, et al. Copper sulfide nanoparticles for photothermal ablation of tumor cells[J]. *Nanomedicine*, 2010, 5(8): 1161-71.
- [9] LONGMIRE M, CHOYKE P L, KOBAYASHI H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats[J]. *Nanomedicine*, 2008, 3(5): 703-717.
- [10] PETROS R A, DESIMONE J M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(8): 615-627.
- [11] ZHOU M, LI J J, LIANG S, et al. CuS nanodots with ultrahigh efficient renal clearance for positron emission tomography imaging and image-guided photothermal therapy[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(7): 7085-7096.
- [12] PENG S W, HE Y Y, ER M, et al. Biocompatible CuS-based nanoplatforms for efficient photothermal therapy and chemotherapy in vivo[J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(3): 475-484.
- [13] WANG P, SHEN M Q, ZHOU H, et al. MOF-derived CuS@Cu-BTC composites as high-performance anodes for Lithium-Ion batteries[J]. *Small*, 2019, 15(47): e1903522.
- [14] LI X J, ZHOU J J, DONG X N, et al. *In vitro* and *in vivo* photothermal cancer therapeutic effects of gold nanorods modified with mushroom β -glucan[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(16): 4091-4098.
- [15] WANG R P, HE Z S, CAI P J, et al. Surface-functionalized modified copper sulfide nanoparticles enhance checkpoint blockade tumor immunotherapy by photothermal therapy and antigen capturing[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(15): 13964-13972.
- [16] GUO L R, PANDERI I, YAN D D, et al. A comparative study of hollow copper sulfide nanoparticles and hollow gold nanospheres on degradability and toxicity[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(10): 8780-8793.
- [收稿日期] 2019-12-17 [修回日期] 2020-04-30
[本文编辑] 陈盛新