

共载光敏剂/UCNPs/双氢青蒿素脂质体的制备及其体外抗肿瘤活性评价

彭剑青, 邹颖, 徐金转, 刘丽娜, 陶玲, 黄静, 肖长帅, 陈艺*

贵州医科大学, 贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心(贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室, 贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室, 天然药物资源优效利用重点实验室), 药学院, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 开发共载光敏剂玫瑰红(rose-bengal, RB)/上转换纳米粒(upconverting nanoparticles, UCNPs)/双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)的脂质体(LIP-RUD), 并初步考察其体外抗结肠癌活性。方法 采用溶剂热法和配体交换法制备水溶性UCNPs, 通过薄膜分散法包载RB/UCNPs/DHA得到LIP-RUD; 采用HPLC法检测LIP-RUD的包封率, 用透射电子显微镜和粒径仪考察其理化性质; 通过SOSG探针检测脂质体产生活性氧(ROS)的效率; 采用激光共聚焦显微镜观察HCT-116结肠癌细胞对LIP-RUD的摄取情况, 并用MTT法评价其体外抑制细胞生长的效果。结果 制备得到的LIP-RUD粒径约150 nm, 表面电位约-12 mV, RB和DHA包载效率分别达到54.5%和86.5%。UCNPs介导的光敏剂能量转换效率达49.8%; 激光照射后, 有大量单线态氧(singlet oxygen, 1O_2)的生成, LIP-RUD中DHA的12 h累积释放率达到74.9%, 相比于无光照组提高了25.6%。细胞实验表明, LIP-RUD能够显著提高药物对结肠癌细胞生长抑制作用, 在激光照射下半数有效抑制浓度(IC₅₀)为15.33 $\mu\text{mol/L}$ 。结论 LIP-RUD为治疗结肠癌提供了光动力化疗联用的新思路, 该脂质体平台有望增强光动力治疗的体内穿透性和光动力化疗的联合作用效果。

关键词: 上转换纳米粒; 玫瑰红; 双氢青蒿素; 活性氧; 脂质体; 光敏剂; 结肠癌; 溶剂热法; 配体交换法; 薄膜分散法; 细胞摄取; MTT法; 单线态氧; 抑制作用

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4151-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.007

Preparation of co-loading photosensitizer/UCNPs/dihydroartemisinin liposomes and evaluation of its *in vitro* antitumor activity

PENG Jian-qing, ZOU Ying, XU Jin-zhuan, LIU Li-na, TAO Ling, HUANG Jing, XIAO Chang-shuai, CHEN Yi
Guizhou Province Specialized Natural Medicine Resource Efficient Utilization Engineering Center (Key Laboratory of Pharmacology and Pharmacological Evaluation of Natural Medicines in Guizhou Higher Education Institutions, Guizhou Medical University-Guiyang Joint Key Laboratory, Key Laboratory of Utilization of Natural Medicine Resources), College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To develop the photosensitizer rose-bengal (RB)/upconverting nanoparticles (UCNPs)/dihydroartemisinin (DHA) co-encapsulated liposomes (LIP-RUD) and preliminarily study the *in vitro* inhibition effects on human colon cancer. **Methods** The hydrophilic UCNPs were synthesized by solvothermal and ligand conversion and RB/UCNPs/DHA were encapsulated by thin-film dispersion method to obtain LIP-RUD. HPLC was performed to determine the loading ratio (LR) of RB and DHA. Zetasizer was used to evaluate the physicochemical properties of liposomes. The production of ROS was investigated by SOSG probe. *In vitro* cellular uptake of LIP-RUD was observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and the cytotoxicity on HCT-116 cells was estimated by MTT assay. **Results** LIP-RUD showed an average particle diameter of 150 nm with zeta potential of -12 mV. The LR of

收稿日期: 2020-03-11

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(81960647); 贵州省科技厅科学技术基金项目(黔科合基础[2019]1255号); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究基金(QZYY-2018-093); 贵州医科大学博士启动基金(YJ2017-27); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201810660018)

作者简介: 彭剑青(1990—), 男, 博士, 副教授, 从事多功能纳米联合递药平台开发。Tel: 17684202475 E-mail: pengjianqing90@126.com

*通信作者 陈艺(1989—), 贵州贵阳人, 女, 博士, 副教授, 从事新型药物递送系统研究。

Tel: 17625904136 E-mail: chenyl_19890319@126.com

#并列第一作者, 邹颖(1997—), 女, 江西抚州人, 在读硕士, 从事药物新剂型与药物代谢研究。

Tel: 18300850282 E-mail: zouying9710@163.com

RB and DHA were 54.5% and 86.5%, respectively. The energy conversion efficiency of UCNPs and RB reached 49.8%. After irradiation, the singlet oxygen ($1O_2$) was generated and 74.9% of encapsulated DHA was released from LIP-RUD at 12 h, which showed an improvement of up to 25.6% compared to the absence of laser irradiation group. In cellular experiments, LIP-RUD exerted improved cytotoxicity on HCT-116 cells. IC_{50} was 15.33 $\mu\text{mol/L}$ under laser irradiation. **Conclusion** LIP-RUD provides a new thought in the treatment of human colon cancer by the combination of photodynamic therapy (PDT) and chemotherapy, which is expected to enhance the penetration depth of PDT and the therapeutic effect of combination therapy.

Key words: upconverting nanoparticles; rose-bengal; dihydroartemisinin; reactive oxygen; liposomes; photosensitizer; colon cancer; solvothermal method; ligand exchange method; film-dispersion method; cellular uptake; MTT method; singlet oxygen; inhibitory effects

光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 是一种新型治疗方式, 现已被用于黑色素瘤、鲜红斑痣、老年黄褐斑变性等发于浅表的疾病治疗^[1-3]。在 PDT 的治疗过程中, 需要将光敏剂导入靶组织, 利用特定波长和能量密度的激光照射后发生光敏反应, 产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 诱导细胞凋亡和死亡, 从而起到治疗的作用^[4]。但是, 光敏剂的激发波长在紫外或可见光范围内, 波长短穿透力弱, 对病灶部位远离机体表面的疾病治疗作用较差。

近年来, 研究者开发了激发波长正好位于“光学透明窗口” (600~1100 nm) 的上转换纳米粒子 (upconverting nanoparticles, UCNPs), 具有良好的生物组织穿透性^[5]。因此, UCNPs 可将组织穿透深度较深的近红外光转换为可用于激发光敏剂玫瑰红 (rose-bengal, RB) 的紫外/可见光, 作为 PDT 中的能量传递体可有效解决紫外/可见光激发光敏剂时存在的生物组织穿透力差的问题, 提高光敏剂体内 ROS 产生效率, 拓展 PDT 的应用范围和增强该疗法的临床治疗效果^[6]。

针对单一治疗手段在肿瘤治疗遇到的耐药、转移和复发等问题, 可采用 2 种或多种不同的治疗手段, 相互促进、共同作用, 以达到提高抗肿瘤效果的目的。研究表明^[7-9], 光动力化疗利用 PDT 产生大量的胞内 ROS 诱导细胞凋亡和死亡, 联合化学药物治疗, 通过不同机制抑制肿瘤生长, 表现出良好的协同增效作用。

双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 是一种具有抗结肠癌潜力的中药活性成分, 可通过影响细胞线粒体跨膜电位, 诱导 ROS 的产生引起线粒体功能障碍和细胞自噬的发生, 从而导致肿瘤细胞凋亡^[10-12]。研究表明, DHA 可通过产生 ROS 增强化疗药物对肿瘤细胞的杀伤, 实现化学增敏作用, 防止化疗药物耐药性的产生^[13-14]。因此, 基于光学能

量传递原理, 利用 UCNPs 和光敏剂 RB 介导光动力效应生成过量 ROS, 而 DHA 可通过引起线粒体功能障碍诱导 ROS 产生的特征, 提出一种由 RB、UCNPs 和 DHA 组成的光动力化疗联合给药方案。相比于临床常用化疗药物, 如阿霉素、紫杉醇和喜树碱等, DHA 能够有效协同光动力效应, 通过不同途径生成 ROS, 显著升高胞内 ROS 水平, 产生氧化应激, 促使细胞周期停滞, 诱导细胞凋亡、自噬和铁坏死, 发挥抗结肠癌作用。

但是, 临床应用 RB/UCNPs/DHA 光动力化疗组合依然面临 2 个问题: 一个是给药后药物的体内循环时间短、生物利用度低, 并可能由于全身性逃逸导致毒副作用^[15]。另一个是 RB、UCNPs 和 DHA 由于粒径尺度、相对分子质量等理化性质的显著差异导致体内分布特征差别较大。因而, 以游离药物形式给药无法实现 RB/UCNPs/DHA 药物组合在靶部位的特异性和同步性聚集, 从而无法有效实现高效的光热转换和光动力化疗作用, 构建一种能够同时包载 RB、UCNPs 和 DHA 的纳米制剂用于结肠癌治疗是解决该问题有效手段。

脂质体作为一种良好的药物载体, 具有毒性低和生物相容性高的特点。由于脂质体同时具有水性内核和磷脂双分子层包膜, 因而能够同时包载亲水和亲脂性药物, 是联合给药药物组合的良好递送载体^[16]。因此, 本研究提出构建一种共载 RB、UCNPs 和 DHA 的多功能脂质体 (LIP-RUD)。利用具有 ROS 敏感的 DOPC 构建脂质层, 而释放出来的游离 RB、UCNPs 和 DHA 可进一步促进 ROS 水平的升高, 形成 ROS 的自增强效应, 促使 RB/UCNPs/DHA 药物组合在外部光照条件下快速和完全释放, 实现光动力化疗联用有效抑制结肠癌细胞增殖的作用。

目前, 开发用于同时递送光敏剂、UCNPs 与化疗药物的功能化脂质体的研究报道较少。本研究通过脂质体处方工艺摸索、制剂表征和体外抗肿瘤评

价, 为用于结肠癌治疗的光动力化疗纳米制剂开发提供了新思路。

1 仪器与材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (HPLC), 安捷伦科技(中国)有限公司; AUW-120D 型精密分析天平, 岛津企业管理(中国)有限公司; Beidi-650E 型超声波细胞破碎仪, 南京贝帝实验仪器有限公司; HW-80A 型旋涡混合器, 上海驰唐电子有限公司; Hedera ODS-C₁₈ 色谱柱, 江苏汉邦科技有限公司; LSM800 型激光共聚焦扫描显微镜 (CLSM), 德国卡尔蔡司(上海)管理有限公司; RE52AA 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; 日立 F-7000 荧光光谱仪, 天美科学仪器有限公司; SHZ-DC (III) 循环水多用真空泵, 南京贝帝实验仪器有限公司; Tecnai12 型透射电子显微镜 (TEM), 荷兰飞利浦有限公司; TG16 型超速离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; Zetasizer Nano-ZS90 型粒度分析装置, 马尔文仪器有限公司。

六水氯化钇 (YCl₃·6H₂O, 批号 Y119236)、六水氯化镱 (YbCl₃·6H₂O, 批号 Y119057)、六水氯化铒 (ErCl₃·6H₂O, 批号 CD123704), 质量分数均 ≥98%, 均购自上海麦克林生化科技有限公司; 1,2-二油酰基磷脂酰胆碱 (DOPC), 批号 LP-R4-070, 质量分数 ≥98%, 瑞士 Corden Pharma 公司; 胆固醇 (Cholesterol, Chol, 批号 C104028, 质量分数 ≥95%)、柠檬酸 (批号 C112635, 质量分数 ≥99%)、油酸 (批号 O108484, 质量分数 ≥95%)、孟加拉玫瑰红 (RB, 批号 R104991, 质量分数 ≥95%)、双氢青蒿素 (DHA, 批号 D110217, 质量分数 ≥98%)、聚乙二醇 100 硬脂酸酯 (PEG-s100, 批号 P139719, 质量分数 ≥99%), 均购自于阿拉丁试剂(上海)有限公司; 胎牛血清 (Fetal Calf Serum, FBS, 批号 12003), Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司; HCT-116 细胞 (批号 CM-H097), 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所上海细胞库; 单线态氧绿色荧光探针 (SOSG, 批号 S36002), Thermo Fisher (Molecular Probe) 公司; Slow Fade Diamond 抗淬灭剂 (批号 S36972), Thermo Fisher Scientific; 四甲基氮唑蓝 (MTT, 批号 ST316), 碧云天生物技术研究所; Hoechst 33342 细胞核染色剂 (批号 C0031), Solarbio 公司; 甲醇、乙腈为色谱纯, 均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司; 其他试剂均为分析纯, 均购自重庆茂业化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 合成水溶性 NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ UCNPs 及其形态观察

以溶剂热法合成 NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ 上转换发光纳米粒子^[17]。按化学计量比称量 0.78 mmol YCl₃·6H₂O、0.2 mmol YbCl₃·6H₂O 和 0.02 mmol ErCl₃·6H₂O, 加至油酸和十八稀的混合液中, 于 160 °C 搅拌 30 min。称量 0.1 g NaOH 和 0.148 g NH₄F 加入甲醇溶解, 转移至上述混合液中, 氩气氛下升温至 75 °C 并搅拌 60 min, 除去甲醇和氧气, 再加热升温至 300 °C, 保持此温度搅拌 90 min。样品自然冷却至 30 °C, 加入丙酮沉化、离心, 重复 3 次。最后将得到的 NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ UCNPs 分散到环己烷溶液中。

通过柠檬酸-油酸配基交换实现 UCNPs 的水相分散^[18]。将制备的 UCNPs 环己烷溶液与 0.2 mol/L 的柠檬酸缓冲液进行等体积混合, pH 调至 4, 置水浴振荡 3 h, 再转移至分液漏斗, UCNPs 由上层的环己烷转移到下层的柠檬酸缓冲液中, 收集水相, 得柠檬酸盐包覆的上转换纳米粒子。反应结束后, 加丙酮沉化、离心, 重复 2 次, 最终样品定量分散在 10 mL 去离子水中。

取一定量 UCNPs 用 1% 磷钨酸负染, 滴至专用铜网上, 挥干水分后, 在 120 kV 加速度电压下采集 TEM 图像, 观测制剂的尺寸和形貌。如图 1-A、B 所示。UCNPs 的平均尺寸约为 30 nm, 具有良好的分散性和单一的尺寸分布, 呈现六角棱形; 相转移后 UCNPs 的尺寸和分散性无显著变化, 而外观更接近规整的圆球形, 部分纳米粒子的边缘出现白色条带, 推测可能是形成了水化膜的原因。

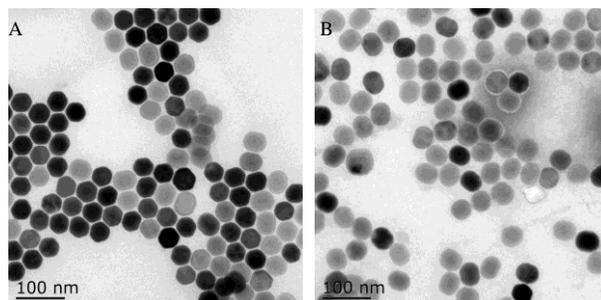


图 1 相转移前油溶性稳定的 UCNPs (A) 和相转移后柠檬酸盐稳定的水溶性 UCNPs (B)

Fig. 1 Oil soluble stable UCNPs before phase transition (A) and citrate stable hydrophilic UCNPs after phase transition (B)

2.2 共载 RB/UCNPs/DHA 的脂质体制备及其形态观察

采用薄膜分散法制备共载 RB/UCNPs/DHA 的脂质体。按照质量比 30 : 3 : 3 : 1 精密称取 DOPC、Chol、PEG-s100 和 DHA，用适量氯仿溶解，40 °C 旋转减压蒸发除去有机溶剂，瓶壁上形成干燥均匀的脂质薄膜，转移至真空干燥罐中过夜除去残留的氯仿。用 2 mL 的 PBS (含 20 mg UCNPs 和 2 mg RB) 将脂膜水化，在 30 °C 下涡旋，形成脂质体初乳液，探头超声 5 min (功率 360 W，工作 2 s，休息 3 s)，4 000 × g 离心 10 min，去除未包载的 UCNPs，0.45 μm 微孔滤膜整粒，即得共载 RB/UCNPs/DHA 的脂质体 LIP-RUD。同法，分别制备单独包载 RB 的脂质体 (LIP-R)，单独包载 DHA 的脂质体 (LIP-D) 和共载 RB/UCNPs 的脂质体 (LIP-RU) 作为对照。

利用脂质体的亲水性内核和脂质双分子层结构，将水溶性的 RB 和 UCNPs 在水合时包载入脂质体内部，而将脂溶性 DHA 在薄膜分散时插入磷脂双分子层中，实现 RB/UCNPs/DHA 的共同包载得到 LIP-RUD，其结构示意图如图 2 所示。按“2.1”项处理方法通过 TEM 观察空白脂质体 (LIP) 与 LIP-RUD 外观形态。如图 3-A 和 B 所示，LIP 与 LIP-RUD 呈类圆形结构，且均有明晰的脂质膜层；

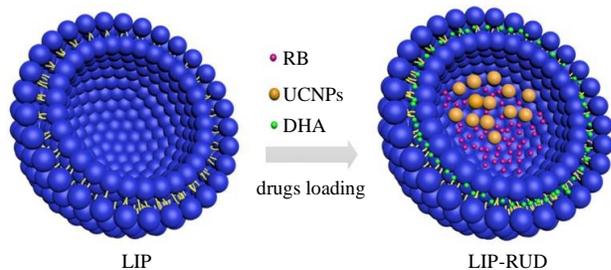


图 2 LIP 和 LIP-RUD 的结构示意图

Fig. 2 Structural representations of LIP and LIP-RUD

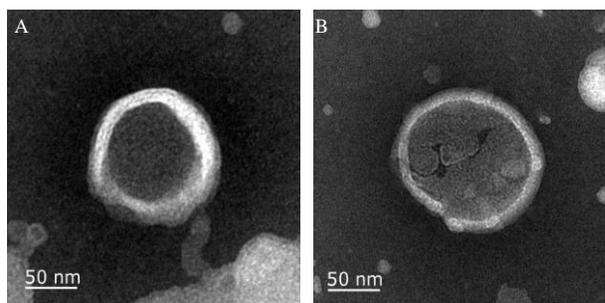


图 3 通过 TEM 观测 LIP (A) 和 LIP-RUD (B) 的形貌

Fig. 3 Morphology of LIP (A) and LIP-RUD (B) observed by TEM

LIP 内部均一，而 LIP-RUD 内部明暗不一，有团聚物。根据 TEM 的标尺可以测得 LIP 粒径约为 140 nm，LIP-RUD 粒径约为 150 nm，而 LIP-RUD 结构中有一些类圆球形团聚物的直径约为 20~30 nm，推测为 UCNPs。因此，TEM 的结果表明通过薄膜分散法成功制备了包载了 RB/UCNPs/DHA 的脂质体 LIP-RUD。

2.3 药物包载效率的测定

取载药脂质体 1 mL，用乙腈定容到 10 mL，超声 15 min 破坏脂质体溶解 RB 和 DHA，采用 HPLC 法测定制剂中的药物含量。RB 的液相测定方法为 Hedera ODS-C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 4.6 mm，5 μm)，甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵水溶液 (35 : 65)，波长 556 nm，体积流量 1 mL/min，柱温 35 °C，进样量 20 μL。DHA 的液相测定方法为 Hedera ODS-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm，5 μm)，流动相为乙腈-水 (60 : 40)，检测波长 210 nm，体积流量 1 mL/min，柱温 35 °C，进样量 20 μL。按照公式计算药物的包载效率 (loading ratio, LR)，式中 M_L 为包载入制剂中的药物量，M_A 为药物的投药量。

$$LR = M_L / M_A$$

结果见表 1，相比于 LIP-R，LIP-RU 中 RB 的 LR 由 84.8% 降低至 55.2%。由于 UCNPs 和 RB 是在水合时通过被动载药进的方式入脂质体，推测可能是由于 RB 与 UCNPs 间的相互作用，以及 UCNPs 竞争性与磷脂相互作用，阻碍了 RB 被包载进入脂质体。然而，DHA 的 LR 没有因为 RB 和 UCNPs 包载而下降，在 LIP-D 和 LIP-RUD 中 DHA 的 LR 均大于 85%。

2.4 粒径及表面电位

取一定浓度的 LIP、LIP-RU、LIP-D、LIP-RUD，利用马尔文粒径电位仪对脂质体的粒径、粒径分布和表面电位进行测定。结果如表 2 所示，LIP-RU 的粒径相比于 LIP 没有发生较大变化，推测是因为 RB 和 UCNPs 被包封于脂质体亲水内核中，对脂质体

表 1 各制剂组中 RB 和 DHA 的 LR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 LR of RB and DHA in different preparations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	LR _{RB} /%	LR _{DHA} /%
LIP-R	84.8 ± 2.2	—
LIP-RU	55.2 ± 3.5	—
LIP-D	—	87.7 ± 2.3
LIP-RUD	54.5 ± 0.8	86.5 ± 2.7

表 2 各制剂组的粒径和电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Size and potential of all preparations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	粒径/nm	粒径分布指数	Zeta 电位/mV
LIP	143.5±0.9	0.180±0.024	-8.66±1.08
LIP-RU	143.2±0.9	0.151±0.032	-7.86±1.60
LIP-D	150.7±3.2	0.204±0.022	-12.40±1.22
LIP-RUD	150.6±1.1	0.198±0.013	-11.97±1.14

膜的流动性和成形性没有显著影响；而 DHA 是通过插入脂质体的双分子层结构的方式被包载，因此改变了膜的流动性和延展性，使粒径略微增大至 150.7 nm。当共同包载 3 种药物后，LIP-RUD 粒径为 150.6 nm，该测定结果与 TEM 观测结果一致。脂质体 Zeta 电位在 -7~-12 mV，表明药物包载对脂质体表面电位影响较小，因此可以推测大部分药物被包载进入脂质体中，吸附在脂质体表面的较少。

2.5 上转换荧光光谱和 UCNPs 能量传递效率检测

在 980 nm 半导体激光器激发下，采用荧光光谱仪进行上转换荧光光谱分析，结果如图 4 所示。首先，测定了 LIP-U 的稳态上转换发光光谱和 RB 吸收光谱，图 4-A 中虚线曲线为 980 nm 激发下 LIP-U 的上转换光谱，实线曲线为 RB 的吸收光谱，上转换绿光带发射光谱在 510 至 570 nm 和 RB 的吸收谱发生重叠，该结果表明，UCNPs 和 RB 分子可以分别充当能量供体和能量受体，UCNPs 的绿色发射部分可以被 RB 吸收，具备能量传递的条件。但是，这种能量转移的过程只有在供体和受体分子足够接近的情况下才会发生，并且 UCNPs 的绿光带将发射淬灭^[19]。因此，当 RB 和 UCNPs 同时包载于脂质体中时，观测到辐射能量转移结果如图 4-B 所示，LIP-RU（实线曲线）在 980 nm 激发下的发光强度因为能量传递作用发生了明显的降低，而虚线曲线的荧光强度基本保持不变。由此证明了通过将 RB 和 UCNPs 同时封装在脂质体内部，可以实现从 UCNPs 绿光带到光敏剂 RB 的能量传递。

根据公式计算 UCNPs 能量传递效率 (E)，式中， I_1 为发生能量传递前 UCNPs 上转换绿光带发光强度， I_2 为发生能量传递后 UCNPs 上转换绿光带发光强度。结果表明，UCNPs 与 RB 的能量传递效率为 49.8%。

$$E = (I_1 - I_2) / I_1$$

2.6 荧光探针检测 ROS 产生

SOSG 荧光探针具有微弱的蓝色荧光，激发波

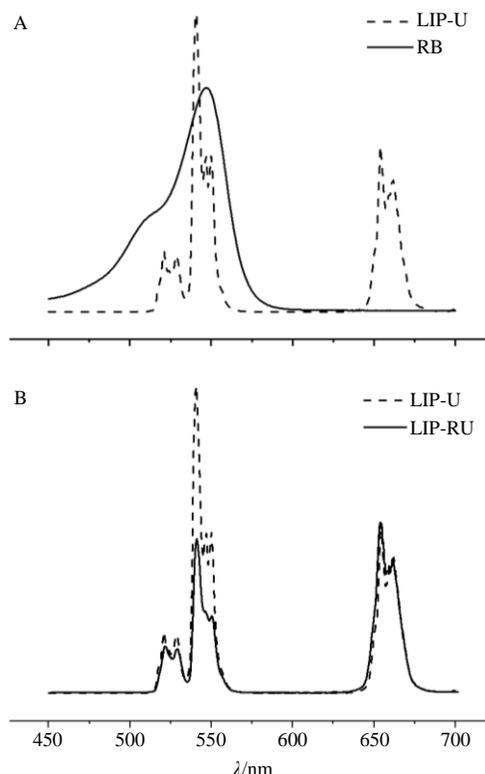


图 4 LIP-U 上转换发射光谱和 RB 紫外-可见吸收光谱 (A) 以及 980 nm 波长激发下 LIP-U 和 LIP-RU 上转换发射光谱 (B)

Fig. 4 Upconversion emission spectrum of LIP-U and UV-vis absorption spectrum of RB (A) and upconversion emission spectra of LIP-U and LIP-RU under 980 nm excitation (B)

长 (E_x) 为 372 nm 和 393 nm，发射波长 (E_m) 为 395 nm 和 416 nm^[20-21]，而当单线态氧 (singlet oxygen, $1O_2$) 存在时，SOSG 探针可以发出绿色荧光 (E_x/E_m 504/525 nm)。将 2 mL 脂质体与 10 μ L 的 SOSG (0.5 mmol/L) 混合并置于比色皿中，然后在暗室中利用 980 nm 激光器以 1.5 W/cm² 功率进行持续照射，每隔 1 min 在 E_x/E_m 504/525 nm 条件下测定 SOSG 荧光强度。根据公式计算每个时间点的 SOSG 荧光强度增加百分率 (φ)，绘制随时间变化曲线。

$$\varphi = (I_t - I_0) / I_0$$

I_t 是每组样品 t 时间点测定的 SOSG 荧光强度， I_0 是每组样品初始测到的 SOSG 荧光强度

结果见图 5，LIP、LIP-U 和 LIP-R 3 个制剂组随着光照时间延长，荧光信号的并未出现显著增强，表明分别单独包载 RB 或 UCNPs 的脂质体在 980 nm 激光照射下均不能产生 $1O_2$ ；而随着光照时间的延长，LIP-RU 和 LIP-RUD 均产生了显著的荧光增

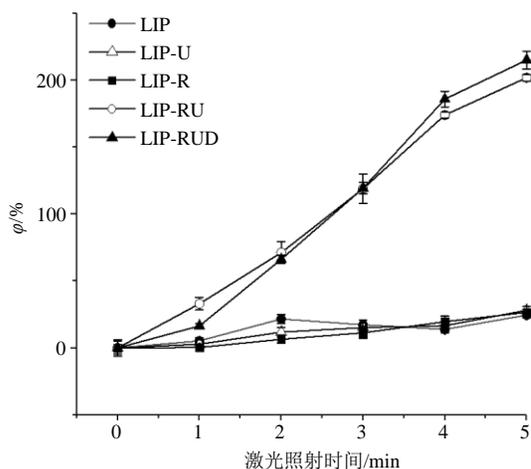


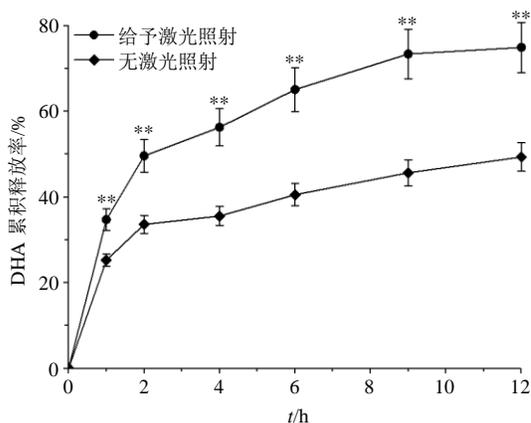
图 5 SOSG 荧光强度增加百分率 (ϕ) 随 980 nm 激光照射时间的变化曲线 ($n = 3$)

Fig. 5 Increased percentage of SOSG fluorescence intensities (ϕ) exposed to 980 nm laser at different irradiation time ($n = 3$)

强, 表明只有 UCNPs 和 RB 同时包载在脂质体中, 才能在光照后产生 $1O_2$ 。

2.7 LIP-RUD 体外释放考察

取 1 mL 的 LIP-RUD 至透析袋中, 以 50 mL 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4, 10% FBS) 为透析介质, 置于 37 °C 恒温振荡摇床中。待释药 0.5 h 后, 激光器给予光照 (1.5 W/cm^2 , 5 min), 于设定时间点 (1、2、4、6、9、12 h) 取透析介质 200 μL , 并及时补加等量新鲜的透析介质。HPLC 测定 DHA 的浓度, 绘制 DHA 释放曲线。DHA 从 LIP-RUD 中的释药行为如图 6 所示, DHA 在 12 h 累积释放率小于 50%;



表示有光照与无光照组之间: ** $P < 0.01$

Significant difference between with and without laser irradiation groups is represented as ** $P < 0.01$

图 6 在不同光照条件下 DHA 从 LIP-RUD 中的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Release curves of DHA from LIP-RUD under different illumination conditions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

而当给予 5 min 近红外光照射后, DHA 在 12 h 累积释放率显著提高至 74.9%。结果表明, LIP-RUD 具有光触发释药的特性。推测是由于 DOPC 作为不饱和磷脂, 对 $1O_2$ 敏感性较高, 光动力效应产生高水平 ROS 能够氧化 DOPC, 进而引起脂质体膜的结构紊乱和流动性增加, 增加脂质体膜的通透性, 加速药物释放^[22]。

2.8 CLSM 观察 HCT-116 细胞的摄取

取 HCT-116 结肠癌细胞, 以 5×10^4 个/孔的细胞密度接种于 35 mm 的玻底皿中, 孵育 12 h 后吸弃培养液。加入用培养基稀释的 LIP-RUD 样品溶液, 其中 RB 的质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 。37 °C 条件下孵育 0.5、1、2、3 h 后, 用 4 °C PBS 洗涤 5 遍, 加入 1 mL 免疫染色固定液, 室温下固定 15 min。随后, 继续用 4 °C PBS 洗涤 3 遍, 并加入细胞核染色剂 Hoechst 33342 染色 30 min。染色结束后, 用 4 °C PBS 洗涤 5 遍, 滴加抗猝灭剂, 盖上盖玻片, 将玻底皿置于 CLSM 的载物台上, 确定观察区域及层面, 采集 RB 的荧光图像。结果如图 7 所示, 在细胞中加入 LIP-RUD 并孵育 2 h 后, 胞内的荧光强度基本达到峰值, 因而将孵育后 2 h 作为 PDT 的光照的时间点。

2.9 MTT 法考察体外细胞毒性

取对数生长期的 HCT-116 细胞, 消化后制备细胞悬液, 按 1×10^4 个/mL 的细胞浓度接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 200 μL , 培养 12 h 待细胞贴壁。吸弃上层培养液, 加入系列质量浓度各制剂组 (不含血清) 孵育 24 h。期间, 光照组在孵育至 2 h 时, 引导功率密度为 1.5 W/cm^2 的 980 nm 激光由顶部照射板孔 5 min。待孵育结束后, 吸弃培养基, 每孔加入 100 μL 培养基和 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续培养 4 h。然后吸弃培养基并加入 150 μL 的 DMSO 溶解甲臞。最后, 用酶标仪测定各孔在 570 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 以空白培养基为对照, 计算细胞存活, 并用 GraphPad Prism 5 软件 (GraphPad 软件公司, 美国) 计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

游离药物组合和脂质体对 HCT-116 结肠癌细胞的体外增殖抑制作用结果如图 8 所示, 在各 DHA 浓度下 LIP-RUD/Laser 的细胞增殖抑制作用都显著优于其他组, 当 DHA 浓度为 75 $\mu\text{mol/L}$ 时, LIP-RUD/Laser 能够完全抑制结肠癌细胞增殖。各组 IC_{50} 结果为 LIP-RUD/Laser ($IC_{50} = 15.33 \mu\text{mol/L}$) <

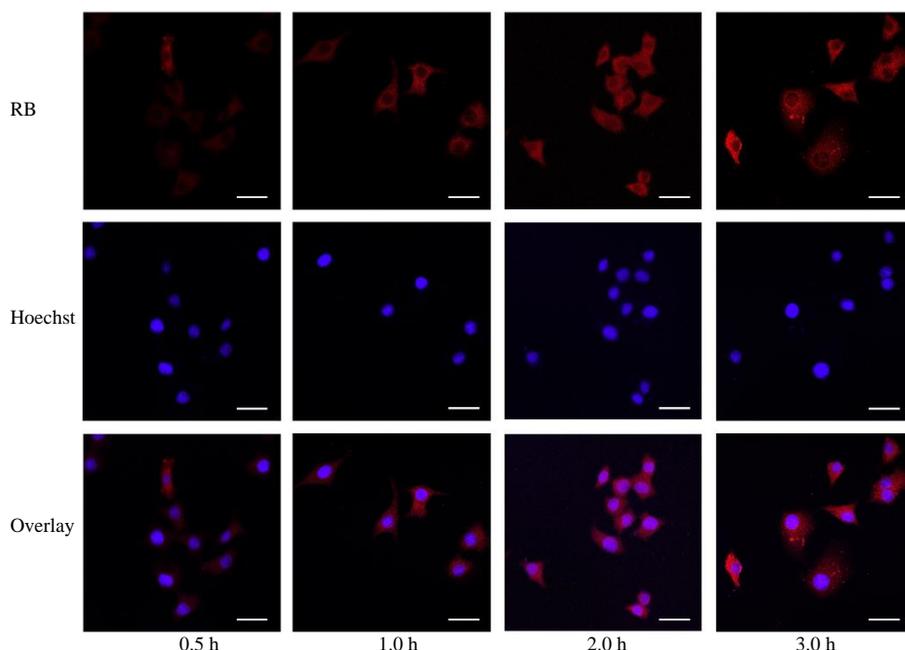
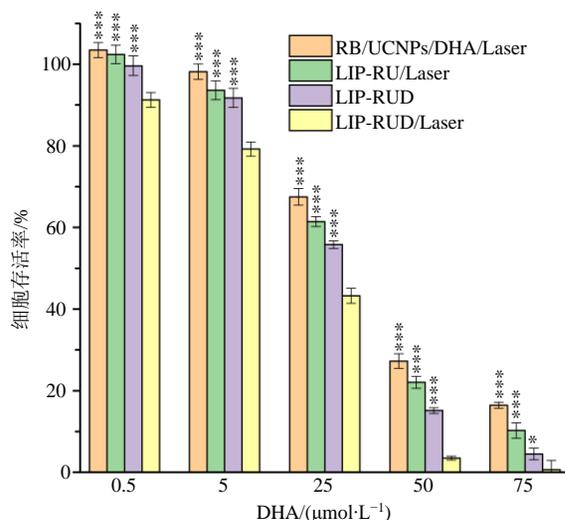


图 7 CLSM 观察 LIP-RUD 在不同时间的细胞摄取情况 (标尺: 20 μm)

Fig. 7 Cellular uptake of LIP-RUD at different time by CLSM (scale: 20 μm)



*和***分别表示相比于 LIP-RUD/Laser 组 $P < 0.05$ 和 $P < 0.001$
Significant differences from LIP-RUD/Laser are represented as * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$

图 8 各制剂组对 HCT-116 细胞的增殖抑制效果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 8 Proliferation inhibition effect of preparation groups on HCT-116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

LIP-RUD ($IC_{50} = 26.90 \mu\text{mol/L}$) < LIP-RU/Laser ($IC_{50} = 29.94 \mu\text{mol/L}$) < RB/UCNPs/DHA/Laser ($IC_{50} = 33.95 \mu\text{mol/L}$)。因此, LIP-RUD/Laser 对结肠癌细胞具有最显著的增殖抑制作用。

3 讨论

光动力疗法是利用光敏剂被激发后发生的光敏反应,生成大量 ROS,诱导细胞凋亡或对细胞产生

致死效应的一种治疗方法;而化疗是使用化学治疗药物,通过抑制肿瘤细胞周期或干扰 DNA 复制、RNA 转录和蛋白质合成代谢过程等,实现抗肿瘤治疗。因此,光动力化疗联用是近年来研究较广的一种微创肿瘤治疗技术,这种治疗方法基于联合不同的肿瘤生长抑制机制,实现了更高效的抗肿瘤作用。针对肿瘤细胞增殖机制的研究发现,适度提高胞内 ROS 水平可调节增殖相关信号通路(如生长因子和酪氨酸激酶通路等)促进细胞增殖,但是过量的 ROS 可引起氧化应激,破坏 DNA、氧化脂质和蛋白质等导致细胞凋亡和坏死^[23]。结肠癌细胞通常 ROS 水平高于正常组织细胞,用于维持其高代谢状态和快速增殖^[24]。研究发现,在结肠癌细胞内高 ROS 水平基础上进一步促进 ROS 生成,是抑制结肠癌细胞增殖的有效方案。因此,在本研究中一方面通过 UCNPs 与 RB 的联用实现 PDT 作用,上调细胞内的 ROS 水平^[25]。另一方面, DHA 通过影响细胞线粒体跨膜电位促进 ROS 生成,使细胞周期停滞发挥抗结肠癌作用。综上, RB/UCNPs/DHA 组合能够在光照和 DHA 的共同作用下上调细胞内 ROS 的水平,有效打破胞内 ROS 平衡机制,使 ROS 水平超过结肠癌细胞耐受阈值而死亡。然而,光动力化疗联合治疗在临床实践过程中受限于激光穿透深度不足、可控性差、药物组合协同性不佳等问题,限制了其临床应用。

基于此,本研究着力解决了以下 3 个问题。首

先, 成功地将体外激发光源由紫外/可见光替换为组织穿透较深的 980 nm 近红外光。具体而言, 摸索处方和工艺, 将 RB 与 UCNP 共同封装于脂质体的内核, 利用 UCNP 的上转换作用, 将近红外光转换为紫外/可见光用于激发 RB 发挥 PDT 作用, 能量传递效率达到 49.8%。其次, 同时包载 RB/UCNP/DHA 药物组合, 成功制备 LIP-RUD。该脂质体粒径约为 150 nm, 粒径分布均一性良好, 电位为 -12 mV 左右, 具有通过增强的渗透与滞留 (enhanced permeability and retention, EPR) 效应被动靶向到达结肠癌部位的潜力。最后, 利用在脂质体中加入具有 ROS 敏感性的 DOPC 脂质材料构建脂质层, 其含有的不饱和双键在 ROS 的作用下可被氧化为脂质过氧化物, 使脂质亲水性增强, 进而破坏磷脂层、释放药物, 从而实现 ROS 介导光触发释药, 并通过 ROS 自增强效应实现了药物的快速和完全释放。由于产生的 ROS 主要以 $1O_2$ 的形式存在, 其具有较高的化学活性能够使荧光探针 SOSG 发生光谱迁移。因此, 通过定量检测 SOSG 光谱迁移后在 E_x/E_m 504/525 nm 条件下的荧光强度, 可评价胞内 ROS 水平的变化。结果表明, 激光照射后 LIP-RU 和 LIP-RUD 组中 SOSG 的发射强度都增强了 200% 以上, 证明有大量 $1O_2$ 的生成。光照产生的 ROS 进而引起了脂质体膜氧化和流动性增大, 明显提高了 LIP-RUD 中 DHA 的释药速率, 相比于未接受光照的 LIP-RUD, 其 12 h 的累积释药量提高了 25.6%。此外, 本研究通过细胞毒性实验初步评价了 LIP-RUD 的抗肿瘤活性。由于观测发现 LIP-RUD 与 HCT-116 细胞孵育 2 h, 细胞摄取达到峰值, 因而, 在细胞毒性研究中将给药后 2 h 作为给予光照的时间点。结果表明, 与未接受光照组 (LIP-RUD)、单独光动力治疗 (LIP-RU/Laser) 和游离药物组相比, LIP-RUD/Laser 在各浓度都表现出对肿瘤细胞显著的增殖抑制作用。

综上, 本研究中制备的 LIP-RUD 脂质体为光动力与化疗联用提供了一个极具潜力的纳米递送平台, 有望增强光动力化疗的抗肿瘤协同效果。未来进一步的研究工作将聚焦于该脂质体的体内稳定性和靶向性, 使其体内分布具有肿瘤部位特异性, 更好地实现高效低毒的肿瘤治疗。

参考文献

[1] Chen J, Fan T, Xie Z, *et al.* Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: Status and challenges

[J]. *Biomaterials*, 2020, 237(12): 119827-119834.

- [2] Yang K Z, Niu T, Luo M Y, *et al.* Enhanced cytotoxicity and apoptosis through inhibiting autophagy in metastatic potential colon cancer SW620 cells treated with Chlorin e6 photodynamic therapy [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2018, 24(4): 332-341.
- [3] 强 帅, 肖志波. 光动力疗法治疗鲜红斑痣的研究进展 [J]. *中国激光医学杂志*, 2018, 27(1): 40-46.
- [4] Hang L, Wei J, Qin W, *et al.* ROS-sensitive biomimetic nanocarriers modulate tumor hypoxia for synergistic photodynamic chemotherapy [J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(9): 3706-3716.
- [5] Calixto G M F, de Annunzio S R, Victorelli F D, *et al.* Chitosan-based drug delivery systems for optimization of photodynamic therapy: A review [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2019, 20(7): 1-17.
- [6] Tian R S, Sun W, Li M L, *et al.* Development of a novel anti-tumor theranostic platform: A near-infrared molecular upconversion sensitizer for deep-seated cancer photodynamic therapy [J]. *Chem Sci*, 2019, 10(43): 10106-10112.
- [7] Xu P P, Wang X Y, Li T W, *et al.* Biomimetic nanozyme for single-wavelength laser activated photothermal-photodynamic synergistic treatment against hypoxic tumors [J]. *Nanoscale*, 2020, 12(6): 4051-4060.
- [8] Zhang L Y, Gao Y, Sun S J, *et al.* pH-responsive metal-organic framework encapsulated gold nanoclusters with modulated release to enhance photodynamic therapy/chemotherapy in breast cancer [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(8): 1739-1747.
- [9] Zeng L Y, Pan Y W, Tian Y, *et al.* Doxorubicin-loaded NaYF₄: Yb/Tm-TiO₂ inorganic photosensitizers for NIR-triggered photodynamic therapy and enhanced chemotherapy in drug-resistant breast cancers [J]. *Biomaterials*, 2015, 57(22): 93-106.
- [10] Wang Z, Hu W, Zhang J L, *et al.* Dihydroartemisinin induces autophagy and inhibits the growth of iron-loaded human myeloid leukemia K562 cells via ROS toxicity [J]. *FEBS Open Bio*, 2012, 2(1): 103-112.
- [11] 高小玲, 罗子国, 王丕龙, 等. 双氢青蒿素诱导前列腺癌 PC-细胞凋亡及其机制研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(1): 81-85.
- [12] 费伟东, 叶铁青, 陈 玥, 等. 双氢青蒿素诱导肿瘤细胞铁死亡及其机制研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(13): 3473-3481.
- [13] Huang X J, Li C T, Zhang W P, *et al.* Dihydroartemisinin potentiates the cytotoxic effect of temozolomide in rat C6 glioma cells [J]. *Pharmacology*, 2008, 82(1): 1-9.

- [14] Hou J, Wang D, Zhang R, *et al.* Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: *In vitro* and *in vivo* activity, chemosensitization, and mechanisms of action [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(17): 5519-5530.
- [15] Tahmasbi R A, Chen C W, Aresh W, *et al.* Combinational effects of active targeting, shape, and enhanced permeability and retention for cancer theranostic nanocarriers [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(11): 10505-10519.
- [16] 马宁辉, 路璐, 丁越, 等. 盐酸阿霉素和知母皂苷 AIII 共载脂质体的制备及包封率的测定 [J]. *中草药*, 2019, 50(1): 69-75.
- [17] Chen Y H, D'Amario C, Gee A, *et al.* Dispersion stability and biocompatibility of four ligand-exchanged NaYF₄: Yb, Er upconversion nanoparticles [J]. *Acta Biomater*, 2020, 102(2): 384-393.
- [18] Cao T Y, Yang T S, Gao Y, *et al.* Water-soluble NaYF₄: Yb/Er upconversion nanophosphors: Synthesis, characteristics and application in bioimaging [J]. *Inorg Chem Commun*, 2010, 13(3): 392-394.
- [19] Huang Y, Hemmer E, Rosei F, *et al.* Multifunctional liposome nanocarriers combining upconverting nanoparticles and anticancer drugs [J]. *J Phys Chem B*, 2016, 120(22): 4992-5001.
- [20] Peng W, de Bruijn H S, Ten Hagen T L M, *et al.* *In-vivo* optical monitoring of the efficacy of epidermal growth factor receptor targeted photodynamic therapy: The effect of fluence rate [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(1): 190-208.
- [21] Poderys V, Jarockyte G, Bagdonas S, *et al.* Protein-stabilized gold nanoclusters for PDT: ROS and singlet oxygen generation [J]. *J Photochem Photobiol B, Biol*, 2020, 204(3): 111802-111811.
- [22] Bacellar I O L, Baptistaete M S, Junqueira H C, *et al.* Permeability of DOPC bilayers under photoinduced oxidation: Sensitivity to photosensitizer [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2018, 1860(11): 2366-2373.
- [23] Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, *et al.* Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy [J]. *Redox Biol*, 2015, 4(1): 184-192.
- [24] Sreevalsan S, Safe S. Reactive oxygen species and colorectal cancer [J]. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 2013, 9(4): 350-357.
- [25] Mercer A E, Copple I M, Maggs J L, *et al.* The role of heme and the mitochondrion in the chemical and molecular mechanisms of mammalian cell death induced by the artemisinin antimalarials [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(2): 987-996.