

光控释活性氧响应的共载榄香烯和二氢卟吩 e6 脂质体的制备、表征及体外抗膀胱癌 5637 细胞活性研究

王艾佳¹, 田欢², 郭东艳^{1,3}, 赵锋^{2,4}, 岳宝森^{2,5}, 程江雪¹, 邹俊波¹, 史亚军¹, 张小飞^{1,6}, 翟秉涛^{1,6*}

1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046
2. 西安市中医医院 药剂科, 陕西 西安 710021
3. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046
4. 西安市中医医院 赵锋全国老药工传承工作室, 陕西 西安 710021
5. 西安市中医医院 岳宝森全国老药工传承工作室, 陕西 西安 710021
6. 中药芳香产业陕西省高校工程研究中心, 陕西 咸阳 712046

摘要: 目的 制备活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 响应的共载榄香烯 (elemene, Ee) 和二氢卟吩 e6 (chlorin e6, Ce6) 脂质体 (Ee-Ce6-L), 对其理化性质进行表征, 并研究 Ee-Ce6-L 对膀胱癌 5637 细胞的抑制作用。方法 采用 MTT 法筛选榄香烯与 Ce6 (Ee+Ce6) 的协同比例, 通过薄膜水化法制备 Ee-Ce6-L, 并对其形态、粒径、包封率和载药量、稳定性、ROS 生成能力、体外释放度等性能进行表征; MTT 实验考察 Ee-Ce6-L 对 5637 细胞的毒性; Annexin V-FITC/PI 双染实验研究 Ee-Ce6-L 对细胞的凋亡作用; 荧光显微镜及荧光酶标仪考察其对 ROS 生成能力及线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 的影响; 通过免疫印迹法 (Western blotting) 考察凋亡通路相关蛋白的表达。结果 Ee+Ce6 在 40:1~200:1 均具有协同作用, 且在 120:1 时协同效果最好; Ee-Ce6-L 具有较好的稳定性和分散性, 经 660 nm 激光照射后粒径由 (194.27±0.20) nm 变为 (390.97±2.76) nm, ζ 电位由 (-19.06±0.07) mV 变为 (-6.30±0.34) mV; 体外释放实验表明, Ee-Ce6-L 具有缓释和光控释药的双重作用; 榄香烯和 Ce6 的包封率分别为 (94.02±0.38)%、(96.95±0.70)%, 榄香烯和 Ce6 的载药量分别为 (11.51±0.46)%、(2.32±0.01)%; Ee-Ce6-L 有较强的单线态氧生成能力; 体外细胞实验表明, Ee-Ce6-L 能够通过增加 ROS 的产生和降低 MMP, 以及降低 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达, 增加 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax), 裂解的多聚 ADP 核糖聚合酶 (cleaved poly ADP-ribose polymerase, cleaved PARP) 和裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 蛋白的表达, 促进 5637 细胞凋亡。结论 Ee-Ce6-L 具有 ROS 响应释放特性, 其能够通过中药-光疗作用协同抑制 5637 细胞增殖和诱导细胞凋亡。

关键词: 榄香烯; 二氢卟吩 e6; 脂质体; 膀胱癌; 光动力疗法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)05-1647-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.05.006

Preparation and characterization of photo-controlled release and reactive oxygen species-responsive elemene/chlorin e6 co-loaded liposomes and their anti-bladder cancer 5637 cell activity *in vitro*

WANG Aijia¹, TIAN Huan², GUO Dongyan^{1,3}, ZHAO Feng^{2,4}, YUE Baosen^{2,5}, CHENG Jiangxue¹, ZOU Junbo¹, SHI Yajun¹, ZHANG Xiaofei^{1,6}, ZHAI Bingtao^{1,6}

1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China
2. Pharmacy Department, Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710021, China

收稿日期: 2025-10-17

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82505363); 国家自然科学基金青年项目 (82204935); 国家中医药管理局赵锋全国老药工传承工作室建设项目 (国中医药人教函 [2024] 255 号); 国家中医药管理局岳宝森全国老药工传承工作室建设项目 (国中医药人教函 [2025] 181 号); 陕西省教育厅重点科学研究计划项目 (25JR058); 陕西中医药大学学科创新团队项目 (2019-YL11); 西安市卫生健康委员会项目 (2025qn01)

作者简介: 王艾佳 (2003—), 女, 硕士研究生, 从事中药新制剂与新剂型研究。E-mail: 15091611352@163.com

***通信作者:** 翟秉涛 (1990—), 男, 博士, 副教授, 从事中药新制剂与新剂型研究。E-mail: zbp@sntcm.edu.com

3. Shaanxi Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Fundamentals and New Drug Research, Xianyang 712046, China
4. Zhao Feng National Senior Pharmacist Inheritance Studio Xi'an Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710021, China
5. Yue Baosen National Senior Pharmacist Inheritance Studio Xi'an Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710021, China
6. Shaanxi Provincial University Engineering Research Center for Traditional Chinese Medicine Aromatherapy Industry, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective Reactive oxygen species (ROS)-responsive co-loaded elemene (Ee) and chlorin e6 (Ce6) liposomes (Ee-Ce6-L) were prepared, characterization of their physicochemical properties, and evaluated for their inhibitory effects on bladder cancer 5637 cells. **Methods** The synergistic ratio of elemene and Ce6 (Ee + Ce6) was screened using the MTT assay. Ee-Ce6-L was prepared via the thin-film hydration method and characterized for morphology, particle size, encapsulation efficiency, drug loading capacity, stability, ROS generation capacity, and *in vitro* release rate. MTT assays evaluated the cytotoxicity of Ee-Ce6-L against 5637 cells. Annexin V-FITC/PI double staining was used to study the apoptotic effects of Ee-Ce6-L on cells. Fluorescence microscopy and a fluorometer were employed to examine its impact on ROS generation capacity and mitochondrial membrane potential (MMP). Western blotting analysis was conducted to investigate the expression of apoptosis pathway-related proteins. **Results** Ee + Ce6 exhibited synergistic effects across the 40:1 to 200:1 concentration range, with optimal synergy observed at 120:1; Ee-Ce6-L exhibited good stability and dispersibility. After irradiation with 660 nm laser, the particle size changed from (194.27 ± 0.20) nm to (390.97 ± 2.76) nm, and the ζ potential shifted from (-19.06 ± 0.07) mV to (-6.30 ± 0.34) mV. *In vitro* release experiments demonstrated that Ee-Ce6-L exhibits dual functions of sustained release and light-controlled drug release; the encapsulation efficiencies of elemene and Ce6 were $(94.02 \pm 0.38)\%$ and $(96.95 \pm 0.70)\%$, respectively, while the drug loading capacities of Ee and Ce6 were $(11.51 \pm 0.46)\%$ and $(2.32 \pm 0.01)\%$; Ee-Ce6-L exhibited strong singlet oxygen generation capacity; *In vitro* cell experiments demonstrated that Ee-Ce6-L promoted apoptosis in 5637 cells by increasing ROS production and reducing MMP, as well as by decreasing B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein expression while increasing Bcl-2-associated X protein (Bax), cleaved poly ADP-ribose polymerase (cleaved PARP), and cleaved cystein-aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3) protein expression. **Conclusion** Ee-Ce6-L exhibits ROS-responsive release properties and synergistically inhibits 5637 cell proliferation and induces apoptosis through the combined effects of traditional Chinese medicine and phototherapy.

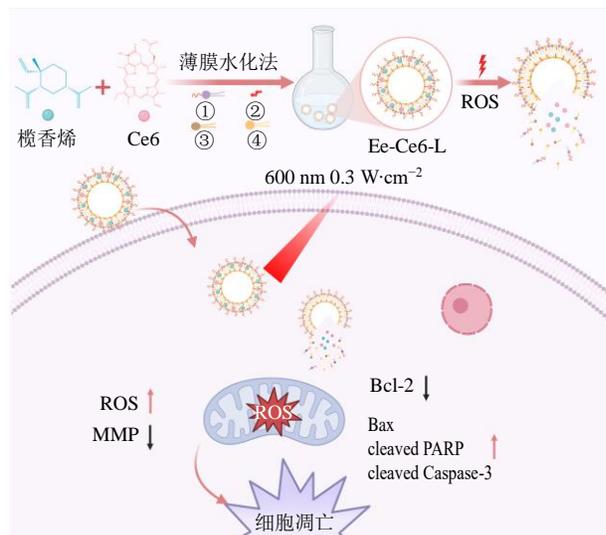
Key words: elemene; chlorin e6; liposome; bladder cancer; photodynamic therapy

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤，复发率高，且传统的手术联合灌注治疗常伴随感染及耐药等不良反应，亟需更有效的治疗策略^[1]。光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 作为一种新型抗癌治疗方法，通过光敏剂与特定波长光照结合产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS)，诱导肿瘤细胞凋亡，具有毒性低、对健康组织损伤小等优势^[2-3]。二氢卟吩 e6 (chlorin e6, Ce6) 是美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的第 2 代光敏剂，具有高 ROS 产率和深层组织渗透能力^[4]。然而，Ce6 强疏水性导致的生理环境下易聚集及肿瘤蓄积率低等问题，限制了其临床疗效^[5]。此外，由于复杂的肿瘤微环境，单一的 PDT 很难根除肿瘤^[6]。

为了突破单一疗法的局限并解决 Ce6 的成药性问题，构建多模态协同给药系统成为研究热点。榄

香烯 (elemene, Ee) 是从姜科姜黄属植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 中提取的抗癌活性成分群，具有多靶点抗肿瘤、逆转耐药、毒性低等多重优势^[7-8]。研究显示，榄香烯能通过增加细胞内 ROS 积累，激活腺苷酸激活蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 通路诱导膀胱癌细胞线粒体途径凋亡^[9-10]。此外，榄香烯与 PDT 联合能够协同抑制肺癌、乳腺癌的生长^[11-12]。然而，榄香烯同样存在水溶性差，生物利用度低等问题^[13]。因此，将榄香烯与 Ce6 联有望增强抗肿瘤活性，但两者均需适宜的递送平台才能发挥最佳效果。脂质体作为经典的纳米载体，不仅能有效改善疏水性药物的溶解度与生物相容性，还能够提升药物在体内的稳定性^[14]。近年来，刺激响应型脂质体，因其能实现药物在病灶部位的靶向释放而受到广泛关注。基于 Ce6 在光照下可产

生大量 ROS 的特性,本研究构建了一种光控释 ROS 响应的共载榄香烯和二氢卟吩 e6 脂质体 (co-loaded elemene and chlorin e6 liposomes, Ee-Ce6-L), 系统表征了其粒径、包封率、体外释放度等理化特性,并通过体外实验,验证其对膀胱癌 5637 细胞的协同抑制作用,以期“中药-光疗”联合抗肿瘤提供新的递送策略 (图 1)。



①-DSPE-PEG₂₀₀₀; ②-胆固醇; ③-PC-98T; ④-大豆卵磷脂; MMP-线粒体膜电位; Bcl-2-B 细胞淋巴瘤-2; Bax-Bcl-2 相关 X 蛋白; cleaved PARP-裂解的多聚 ADP 核糖聚合酶; cleaved Caspase-3-裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3。
①-DSPE-PEG₂₀₀₀; ②-cholesterol; ③-PC-98T; ④-soybean lecithin; MMP-mitochondrial membrane potential; Bcl-2-B-cell lymphoma-2; Bax-Bcl-2-associated X protein; cleaved PARP-cleaved poly ADP-ribose polymerase; cleaved Caspase-3-cleaved cystein-aspartate protease-3.

图 1 Ee-Ce6-L 的制备及诱导膀胱癌细胞凋亡的示意图
Fig. 1 Preparation of Ee-Ce6-L and schematic diagram of inducing apoptosis of bladder cancer cells

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技公司; SP-1920 型紫外可见分光光计, 上海光谱仪器有限公司; ZS90 型纳米粒径电位分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; JEM 2100Plus 型六硼化镧透射电子显微镜, 日本电子株式会社; AR1140 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; KQ-500E 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 371 型二氧化碳培养箱、51119670DP 型酶标仪, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; Ts2-FL 型倒置电子显微镜, 日本尼康株式会社; TD4C 型离心机, 江苏大唐医疗器械有限公司; Spectra MaxM2 型多功能酶标仪, 美谷分子仪器 (上海) 有限公司; DMi8

型荧光倒置显微镜, 德国徕卡相机股份公司。

1.2 试药与试剂

β -榄香烯, 批号 200401, 质量分数 $\geq 98.0\%$, 泰州奥睿锦生物科技有限公司; 榄香烯, 质量分数 $\geq 80.0\%$, 批号 1712161, 大连华立金港药业有限公司; Ce6 (批号 C829662, 质量分数 $> 94.0\%$)、大豆卵磷脂 (批号 C10240935, 质量分数 $> 98.0\%$)、胆固醇 (批号 C10090003, 质量分数 $\geq 99.0\%$), 上海麦克林生化科技有限公司; 1,3-二苯基异苯并呋喃 (1,3-diphenylisobenzofuran, DPBF) 探针, 批号 109767, 上海皓元生物医药科技有限公司; 高纯蛋黄卵磷脂 (Egg yolk lecithin, PC-98T), 批号 AL21002, 质量分数 $> 98.0\%$, 艾伟拓 (上海) 医药科技有限公司; DSPE-PEG₂₀₀₀, 批号 RJ0212708, 西安瑞禧生物科技有限公司; 二甲亚砜 (DMSO), 批号 20241012, 天津市永大化学试剂有限公司; RPMI 1640 基础培养基, 批号 AG29643109, 格来赛生命科技 (上海) 有限公司; ROS 检测试剂盒 (批号 S0033S)、增强型线粒体膜电位试剂盒 (批号 C2003S), 上海碧云天生物技术股份有限公司; 抗 β -肌动蛋白抗体 (anti- β -actin antibody, 批号 66009-1-Ig)、重组 Bcl-2 单克隆抗体 (批号 80313-1-RR), 武汉三鹰生物技术有限公司; 兔抗 cleaved PARP rabbit (批号 5625)、重组 cleaved Caspase-3 抗体 (批号 9661)、Bax 抗体 (批号 2772), 赛信通 (上海) 生物试剂有限公司。

1.3 细胞

人膀胱癌 5637 细胞 (上海中乔新舟生物科技有限公司) 采用 RPMI 1640 培养基 (含有 1% 双抗和 10% 胎牛血清), 于 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养。

2 方法与结果

2.1 榄香烯和 Ce6 协同比例的筛选

采用 MTT 法筛选榄香烯和 Ce6 的协同比例。首先, 将处于对数生长期 5637 细胞, 按照 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 并孵育 12 h, 弃去培养基, 加入不同质量浓度的榄香烯和 Ce6, 继续处理 24 h 后, 除去各孔中培养基, 再向每孔中加入 MTT 溶液, 待 4 h 后, 将 MTT 溶液除去并加入 150 μ L DMSO 溶液, 放入酶标仪中充分振荡, 使紫色结晶充分溶解, 测定其在 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值并采用 CompuSyn1.0 软件计算协同指数 (combination index, CI) 值, 其中 CI < 1 指协同作用; CI = 1 指叠加作用; CI > 1 指拮抗作用^[15]。由表 1 可

知, 榄香烯、Ce6 和 Ce6 (0.3 W/cm²) (指 Ce6 联合 0.3 W/cm² 激光照射) 的 IC₅₀ 值依次为 (179.23 ± 1.43)、(38.96 ± 2.75)、(5.32 ± 0.08) μg/mL。CI 值如表 2 所示, 榄香烯与 Ce6 (Ee+Ce6) 在比例为

40 : 1~200 : 1 时, CI 值均小于 1, 且在 120 : 1 时, CI 值最小, 协同作用最强。

2.2 Ee-Ce6-L 的制备

根据实验室前期研究, 采用薄膜分散法制备脂

表 1 榄香烯、Ce6 和 Ce6 (0.3 W·cm⁻²) 对膀胱癌 5637 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of elemene, Ce6 and Ce6 (0.3 W·cm⁻²) on proliferation of 5637 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

榄香烯/ (μg·mL ⁻¹)	抑制率/%	IC ₅₀ / (μg·mL ⁻¹)	Ce6/ (μg·mL ⁻¹)	抑制率/%	IC ₅₀ / (μg·mL ⁻¹)	Ce6 (0.3 W·cm ⁻²)/ (μg·mL ⁻¹)	抑制率/%	IC ₅₀ / (μg·mL ⁻¹)
50	16.15 ± 1.93	179.23 ± 1.43	1.0	18.67 ± 0.21	38.96 ± 2.75	0.1	8.13 ± 0.59	5.32 ± 0.08
100	28.36 ± 1.37		10.0	24.20 ± 1.55		0.5	10.13 ± 0.32	
150	42.48 ± 0.61		20.0	33.49 ± 1.85		1.0	20.12 ± 0.65	
200	64.91 ± 0.47		40.0	49.40 ± 1.68		5.0	39.58 ± 0.13	
250	83.32 ± 0.18		60.0	77.48 ± 0.30		10.0	64.82 ± 0.23	
300	91.36 ± 0.18		80.0	81.78 ± 0.72		15.0	79.04 ± 0.12	
400	92.50 ± 0.28		100.0	88.73 ± 0.59		20.0	99.12 ± 0.21	

表 2 Ee+Ce6 的 CI 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 CI values of Ee + Ce6 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Ee+Ce6	CI	Ee+Ce6	CI
40 : 1	0.94 ± 0.03	180 : 1	0.86 ± 0.01
100 : 1	0.88 ± 0.04	200 : 1	0.78 ± 0.05
120 : 1	0.77 ± 0.05		

质体^[6]。制备方法如下: 将 15.52 mg L-组氨酸加入 10 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 并加盐酸调节 pH 值至 6.5, 即得水相。然后将大豆卵磷脂、胆固醇、PC-98T、DSPE-PEG₂₀₀₀、榄香烯、Ce6 以质量比为 300 : 30 : 300 : 20 : 120 : 1, 加入 10 mL 乙醇中溶解, 在 55 °C 水浴中旋转减压蒸发, 形成脂质薄膜, 向其中加入水相。在 50 °C 下水化 45 min, 超声 3 min (150 W, 工作 5 s, 停歇 2 s), 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 得到 Ee-Ce6-L。Ce6 脂质体 (Ce6-L) 与榄香烯脂质体 (Ee-L) 制备步骤同 Ee-Ce6-L, 不同之处在于不含榄香烯或 Ce6。如图 2 所示, 所制备的 Ee-Ce6-L 呈灰色。

2.3 Ee-Ce6-L 的表征

2.3.1 Ee-Ce6-L 的形态观察 采用透射电子显微镜

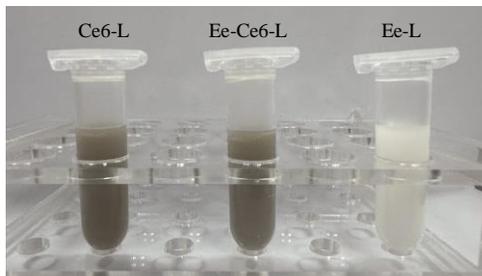


图 2 各脂质体溶液实物

Fig. 2 Photographs of respective liposome solutions

(transmission electron microscope, TEM) 法观察 Ee-Ce6-L 的微观形态。精密量取样品并稀释至一定倍数后, 滴加至 TEM 专用铜网上, 室温放置, 晾干后滴加 2% 磷钨酸溶液进行染色, 1 min 后用滤纸吸取多余染液, 晾干后, 使用 TEM 观察其形态并拍照。结果如图 3 所示, Ee-Ce6-L 呈圆球形, 表面光滑且分散性良好, 而 Ee-Ce6-L 经 660 nm (0.3 W/cm², 3 min) 激光照射后脂质体破裂, 结构完整性被破坏, 部分脂质体出现聚集。

2.3.2 Ee-Ce6-L 粒径和 ζ 电位测定 采用 Malvern 激光粒度仪分别测定 Ee-Ce6-L 和经 660 nm (0.3 W/cm², 3 min) 激光照射的粒度及 ζ 电位。结果如表 3 及图 4 所示, Ee-Ce6-L 的平均粒径为 (194.27 ±

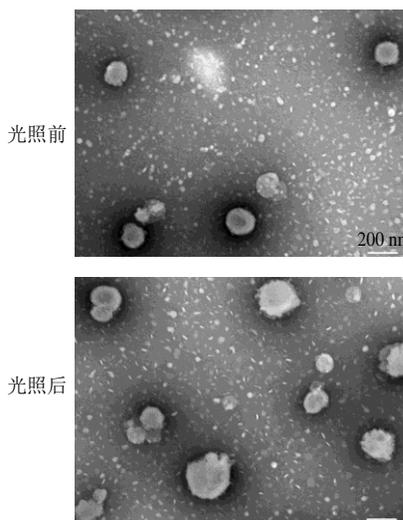


图 3 Ee-Ce6-L 光照前、后 TEM 图 (×100 000, 80 kV)

Fig. 3 TEM images of Ee-Ce6-L before and after illumination (×100 000, 80 kV)

表3 Ee-Ce6-L光照前、后粒径分布和ζ电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Particle size distribution and ζ potential of Ee-Ce6-L before and after illumination ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Ee-Ce6-L	粒径/nm	PDI	ζ电位/mV
光照前	194.27±0.20	0.11±0.02	-19.06±0.07
光照后	390.97±2.76	0.48±0.05	-6.30±0.34

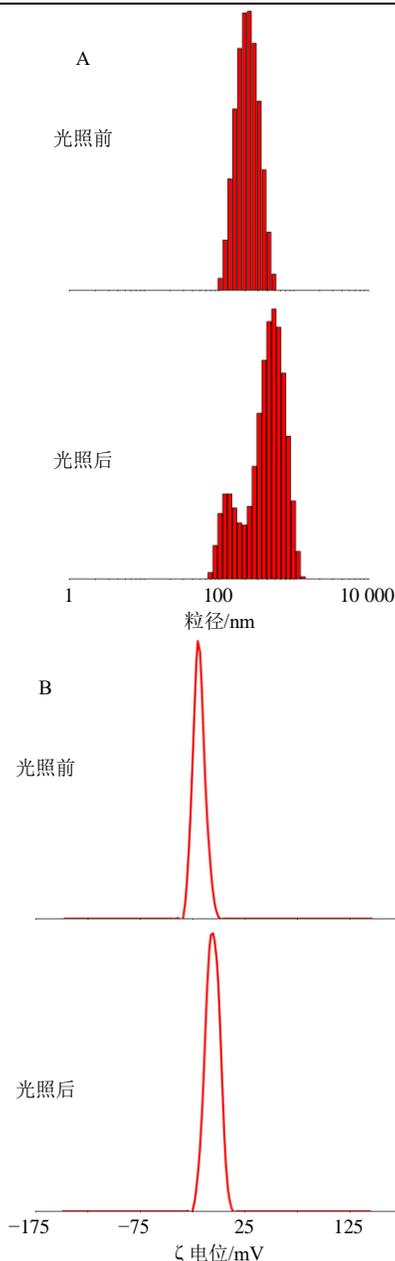


图4 Ee-Ce6-L光照前、后粒径分布 (A) 和ζ电位分布 (B)

Fig. 4 Particle size distribution (A) and ζ potential distribution (B) of Ee-Ce6-L before and after illumination 0.20) nm, 多分散性指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.11 ± 0.02 , ζ 电位为 (-19.06 ± 0.07) mV, $PDI < 0.3$, 说明 Ee-Ce6-L 的粒径分散性良好。将 Ee-Ce6-L 用 660 nm ($0.3 \text{ W/cm}^2, 3 \text{ min}$) 激光照射后, 粒

径、PDI、ζ 电位均发生改变, 这是由于 Ee-Ce6-L 经激光照射后产生大量 ROS, 脂质膜中的不饱和磷脂发生氧化, 进而导致膜结构破坏, 脂质体发生破裂或聚集, 表现为粒径增大、PDI 上升, ζ 电位改变。

2.3.3 Ee-Ce6-L 包封率和载药量测定 采用微滤离心法将游离药物与脂质体分离^[17]; 取 3 份经离心后的 Ee-Ce6-L, 采用 HPLC 测定榄香烯的质量浓度, 使用紫外-可见分光光度计测定 Ce6 的质量浓度。根据公式计算包封率及载药量, 结果如表 4 所示, 榄香烯和 Ce6 的包封率分别为 $(94.02 \pm 0.38)\%$ 和 $(96.95 \pm 0.70)\%$, 载药量分别为 $(11.51 \pm 0.46)\%$ 和 $(2.32 \pm 0.01)\%$ 。

包封率 = 包封于脂质体内药物量 / 脂质体中药物总量

载药量 = 包封于脂质体内药物量 / 载药脂质体总质量

2.3.4 Ee-Ce6-L 稳定性研究 将脂质体分别于低温 ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) 和室温 ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) 储存, 并通过 Malvern 激光粒度仪测定其粒径分布, 每 2 天测定 1 次, 测定 2 周。由表 5 可知, 在低温 ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) 和室温 ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) 储存期间, Ee-Ce6-L 粒径或 PDI 无明显差异, 表明 Ee-Ce6-L 稳定性良好。

表4 Ee-Ce6-L 中榄香烯和 Ce6 的包封率和载药量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Encapsulation efficiency and drug loading of elemene and Ce6 in Ee-Ce6-L ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号	包封率/%		载药量/%	
	榄香烯	Ce6	榄香烯	Ce6
1	93.57	96.14	11.47	2.32
2	94.22	97.29	11.07	2.33
3	94.26	97.42	11.98	2.31
$\bar{x} \pm s$	94.02 ± 0.38	96.95 ± 0.70	11.51 ± 0.46	2.32 ± 0.01

表5 不同温度下 Ee-Ce6-L 的粒径及 PDI 的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Changes of particle sizes and PDI of Ee-Ce6-L at different temperatures ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	粒径/nm		PDI	
	$4 \text{ }^\circ\text{C}$	$25 \text{ }^\circ\text{C}$	$4 \text{ }^\circ\text{C}$	$25 \text{ }^\circ\text{C}$
0	201.70 ± 4.51	202.26 ± 4.51	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.01
2	199.17 ± 2.21	202.03 ± 1.40	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.01
4	198.20 ± 4.20	199.06 ± 3.73	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
6	195.47 ± 1.93	198.73 ± 1.08	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.03
8	198.50 ± 1.15	200.20 ± 5.29	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02
10	201.73 ± 1.01	200.37 ± 4.36	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.02
12	201.60 ± 1.99	201.33 ± 5.16	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.01
14	200.06 ± 1.15	202.73 ± 1.80	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.02

2.3.5 体外释放度测定 采用透析袋法测定 Ee-Ce6-L 的体外释放度。将 2 mL Ee+Ce6、Ee-Ce6-L 及激光照射 (0.3 W/cm², 10 min) 后的 Ee-Ce6-L (Ee-Ce6-L+Laser), 分别装入截留相对分子质量 3.00 × 10⁵ 的透析袋中, 置于 75%乙醇释放介质 (100 mL) 中, 在 37 °C 下磁力搅拌 (100 r/min)。在预设时间 0.5、1、2、6、8、10、12、24、36、48 h 取 1 mL 样品, 并加入等体积的 37 °C 释放介质中。采用 HPLC 法测定样品中榄香烯的含量。结果如图 5 所示, 游离 Ee-Ce6 在初始阶段释放迅速, 48 h 时累积释放率达 83.2%。相比之下, Ee-Ce6-L 的总体释放显著减缓, 48 h 的累积释放率为 57.64%, 表明脂质体包封能有效抑制榄香烯的快速外泄。

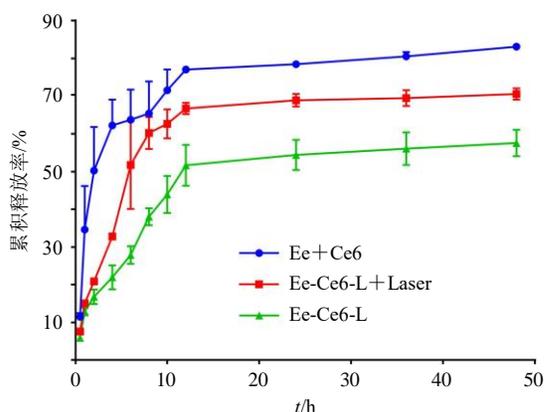


图 5 Ee+Ce6、Ee-Ce6-L+Laser 及 Ee-Ce6-L 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 *In vitro* release curves of Ee + Ce6, Ee-Ce6-L + Laser and Ee-Ce6-L ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 6 Ce6 与不同质量浓度 Ee-Ce6-L 的 ROS 生成能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 ROS generation ability of Ce6 and different concentrations of Ee-Ce6-L ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A值						
		0 s	10 s	20 s	30 s	40 s	50 s	60 s
PBS	-	1.17 ± 0.03	1.18 ± 0.06	1.17 ± 0.03	1.16 ± 0.02	1.15 ± 0.02	1.15 ± 0.02	1.15 ± 0.02
Ce6	1.0	1.17 ± 0.01	1.05 ± 0.04	0.90 ± 0.03	0.77 ± 0.04	0.68 ± 0.06	0.59 ± 0.09	0.52 ± 0.11
Ee-Ce6-L	0.5	1.17 ± 0.01	1.04 ± 0.04	0.82 ± 0.09	0.73 ± 0.02	0.62 ± 0.06	0.49 ± 0.04	0.42 ± 0.02
Ee-Ce6-L	1.0	1.08 ± 0.01	0.89 ± 0.07	0.72 ± 0.09	0.56 ± 0.07	0.43 ± 0.08	0.36 ± 0.05	0.30 ± 0.01
Ee-Ce6-L	2.0	1.09 ± 0.01	0.75 ± 0.06	0.40 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.11 ± 0.02

表明 ROS 的产生具有质量浓度相关性。

2.5 Ee-Ce6-L 对 5637 细胞的抑制作用研究

2.5.1 体外细胞毒性研究 采用 MTT 法测定不同药物对膀胱癌 5637 细胞的毒性。细胞培养方法与“2.1”项相同, 待细胞贴壁后弃去原培养基, 给药组分别加入不同质量浓度的含药培养基, 对照组加入等体积的完全培养基, 含有 Ce6 组加药 6 h 后给予

值得注意的是, Ee-Ce6-L 在 0~12 h 内释放较快, 12 h 累积释放率达 51.73%, 主要归因于部分未被包封的榄香烯及脂溶性成分榄香烯位于脂双层外侧, 可较易扩散进入释放介质; 在 12 h 后, 释放速率逐渐下降并进入平台期, 反映出脂双层包裹的榄香烯需通过跨膜扩散才能释放, 从而形成后期的缓慢释放阶段。这一特征是脂质体递药系统常见的释放行为。Ee-Ce6-L+Laser 组的释放速率进一步提高, 48 h 时累积释放率达 70.62%。这可能是由于 Ce6 被激光激活后产生大量 ROS, 引起脂质体膜结构部分破坏或松动, 加速榄香烯的释放, 这与前文中经激光照射前后脂质体的表征结果一致, 进一步证实了光触发 ROS 生成能够有效破坏脂质体结构。然而, 该组释放速度仍低于游离 Ee-Ce6, 说明脂质体结构未完全崩解, 仍具备一定的扩散阻力, 从而保持了可控释放特性。综上, 脂质体包封显著降低了榄香烯的初期突释比例, 并延长了药物释放时间。

2.4 Ee-Ce6-L 的 ROS 生成能力检测

使用 DPBF 检测 Ce6 及不同质量浓度 Ee-Ce6-L 生成 ROS 的能力。向 PBS、Ce6 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、Ee-Ce6-L (Ce6 0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 中分别加入 70 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DPBF, 并在功率为 0.3 W/cm², 波长为 660 nm 下激光照射 1 min, 使用紫外-可见分光光度计测定 DPBF 在 415 nm 处的 A 值, 每隔 10 s 记录 1 次。结果由表 6 可知, 相同 Ce6 质量浓度下, Ee-Ce6-L 组 A 值均低于 Ce6 组, 表明 Ee-Ce6-L 组的 ROS 生成能力更强; 高质量浓度 Ee-Ce6-L 下降趋势更明显,

光照, 继续培养 24 h 后, 弃去培养基, 向每孔中加入 100 μL MTT 溶液, 放入培养箱中孵育 4 h 后, 吸除孔中液体, 加入 150 μL DMSO 溶液, 并使用酶标仪测定其在 490 nm 处的 A 值, 并计算 IC₅₀ 值及 CI 值 (CI = DA/IC_{X,A} + DB/IC_{X,B}, 其中, A、B 指 2 种不同药物, DA、DB 指两药联合使用使生长抑制率达到 X 时的质量浓度, IC_{X,A}、IC_{X,B} 表示两药单独

使用时生长抑制率达到 X 时的质量浓度, $CI > 1$ 表示拮抗作用, $CI = 1$ 表示叠加作用, $CI < 1$ 表示协同作用^[18]; 结果如表 7 所示, Ee-L 和 Ce6-L 的 IC_{50} 分别为 (116.73 ± 0.21) 、 $(0.75 \pm 0.03) \mu\text{g/mL}$, 相比于游离药物 IC_{50} 值降低, 表明脂质体能够增强游离药物对膀胱癌 5637 细胞的毒性。Ee-Ce6-L 的 IC_{50} 值为 $(0.39 \pm 0.02) \mu\text{g/mL}$, 相比于相同剂量的 Ce6-L, Ee-Ce6-L 对 5637 细胞毒性显著增强, 且 Ee-Ce6-L 对 5637 细胞的 CI 值小于 1, 表明脂质体中共同负载榄香烯和 Ce6 具有协同作用。

表 7 不同药物对 5637 细胞的毒性及 CI 值计算结果
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Toxicity of different drugs on 5637 cells and calculation results of CI value ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率/%	$IC_{50}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CI	
Ee-L	10	10.25 ± 0.97	116.73 ± 0.21	0.91	
	40	16.09 ± 0.01			
	80	26.03 ± 0.03			
	150	57.97 ± 0.24			
	200	83.68 ± 0.08			
	250	93.90 ± 0.06			
	300	95.88 ± 2.42			
Ce6-L+	0.05	7.45 ± 0.20	0.75 ± 0.03		
	Laser	0.1			18.25 ± 0.17
		0.3			18.87 ± 0.30
		0.5			25.05 ± 0.09
		0.8			52.93 ± 5.59
		1.0			64.19 ± 0.06
Ee-Ce6-L+	0.05	11.75 ± 0.37	0.39 ± 0.02		
	Laser	0.1			25.90 ± 0.39
		0.3			40.49 ± 0.25
		0.5			73.90 ± 4.35
		0.8			86.08 ± 1.37
		1.0			95.63 ± 0.75
		2.0			97.02 ± 0.97

2.5.2 细胞凋亡检测 采用 AnnexinV-FITC/PI 双染实验检测不同制剂对膀胱癌 5637 细胞凋亡率的影响。将 5637 细胞按照 5×10^5 个/孔的密度, 接种于 6 孔板中孵育 12 h。实验共分为 4 组: (1) 对照组; (2) Ee+Ce6 (0.3 W/cm^2) 组; (3) Ce6-L (0.3 W/cm^2) 组; (4) Ee-Ce6-L (0.3 W/cm^2) 组。对照组加入等体积的完全培养基, 其余组加药 6 h 后给予光照, 继续培养 24 h 后, 收集细胞, 用 PBS 重悬细胞, 再

依次加入 AnnexinV-FITC 和 PI 处理细胞, 并使用流式细胞仪对 5637 细胞凋亡率进行检测。结果如图 6 及表 8 所示, 相比于 Ee+Ce6 组, Ee-Ce6-L 组的凋亡率显著增加 ($P < 0.001$), 表明脂质体可以提高游

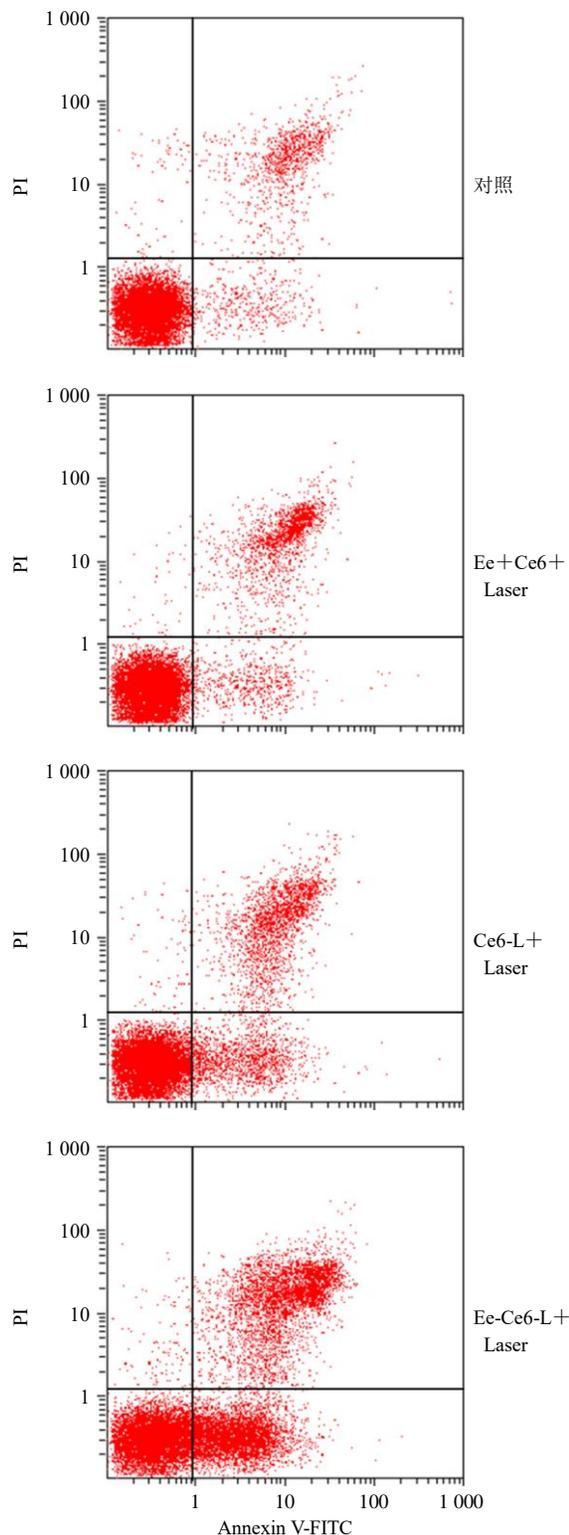


图 6 不同药物对 5637 细胞凋亡率的影响

Fig. 6 Effects of different drugs on apoptosis rate of 5637 cells

离 Ee+Ce6 的凋亡率。相比于 Ce6-L 组, Ee-Ce6-L 组的细胞凋亡率也明显升高 ($P < 0.001$), 表明榄香烯和 Ce6 联用具有协同增效作用。

表 8 不同药物处理 5637 细胞 24 h 后的凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Apoptosis rate of 5637 cells after 24 h treatment with different drugs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物	凋亡率/%	药物	凋亡率/%
对照	4.27±0.65***	Ce6-L	22.26±2.36***
Ee+Ce6	14.87±1.22***	Ee-Ce6-L	40.97±6.10

与 Ee-Ce6-L 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 表 9~11 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs Ee-Ce6-L group; Same as tables 9-11.

2.5.3 ROS 生成量检测 采用荧光探针 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 检测细胞内 ROS 生成情况。细胞处理与“2.5.2”项相同, 24 h 后加入 DCFH-DA 溶液, 培养箱孵育 20 min。随后弃掉上清并用基础培养基清洗 3 次, 使用荧光显微镜观察荧光强度。将膀胱癌 5637 细胞以 5×10^3 个/孔接种于黑色的 96 孔板中, 其余操作同上。处理完后, 采用荧光酶标仪定量检测细胞内 ROS 含量, 分别将激发波长和发射波长设置为 485 nm 和 530 nm^[19]。结果如图 7 及表 9 所示, 经药物处理后的细胞均发出绿色荧光, 表明其均能产生 ROS, 且 Ee-Ce6-L+Laser 组绿色荧光最强。

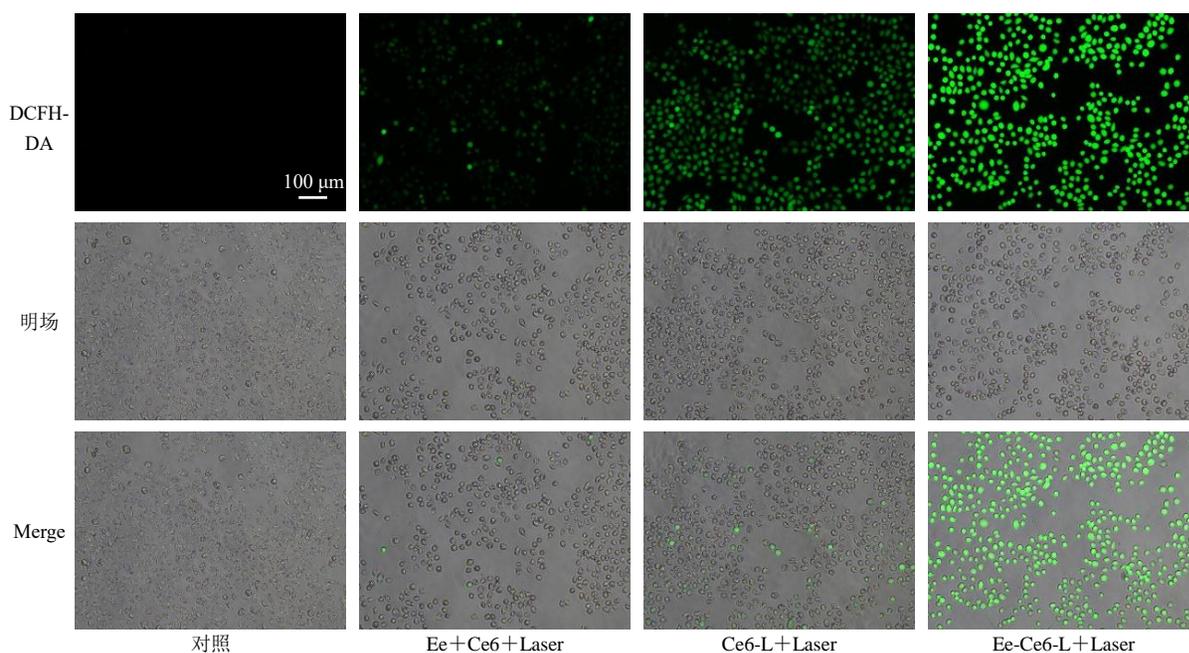


图 7 不同药物处理 5637 细胞内 ROS 水平变化 ($\times 10$)

Fig. 7 Changes in intracellular ROS levels in 5637 cells following different drug treatments ($\times 10$)

表 9 不同药物处理 5637 细胞 24 h 后的 ROS 荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Fluorescence intensity of ROS in 5637 cells after 24 h treatment with different drugs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物	荧光强度	药物	荧光强度
对照	5 267.67±180.99***	Ce6-L	17 965.00±704.04***
Ee+Ce6	8 405.17±304.48***	Ee-Ce6-L	25 630.00±1 634.42

定量分析结果显示, 与对照组相比, Ee+Ce6 组、Ce6-L 组、Ee-Ce6-L 组的细胞荧光强度分别增加 1.59、3.41、4.87 倍。相比于 Ee+Ce6 和 Ce6-L 组, Ee-Ce6-L 组的相对荧光强度更高, 表明榄香烯和 Ce6 共载于脂质体后, 能够显著提高细胞内 ROS

的生成能力 ($P < 0.001$)。

2.5.4 JC-1 探针检测线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 前期处理与“2.5.3”项下 ROS 检测相同, 待细胞孵育 24 h 后加入 2.5 μmol/L JC-1, 于 37 °C 培养 20 min。用 PBS 洗涤后, 用荧光显微镜观察荧光图像, 并用荧光酶标仪分析测量 JC-1 的荧光强度, 红色荧光聚合物的激发和发射波长分别为 525、590 nm, 绿色荧光单体的激发和发射波长分别为 490、530 nm^[20]。结果如图 8 及表 10 所示, Ee+Ce6、Ce6-L 和 Ee-Ce6-L 均能降低 MMP。定量分析结果表明, 与 Ee+Ce6 组和 Ce6-L 组相比, Ee-Ce6-L 组降低 MMP 能力更强 ($P < 0.01$ 、

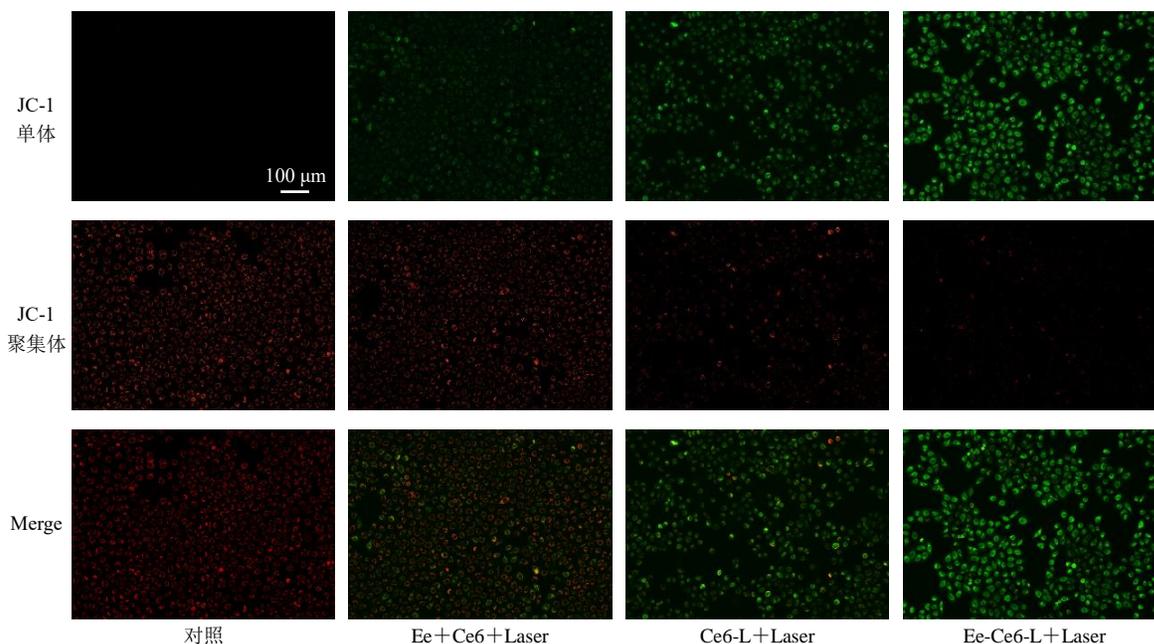


图 8 不同药物对 5637 细胞 MMP 的影响 (×10)

Fig. 8 Effects of different drugs on MMP in 5637 cells (× 10)

表 10 不同药物处理 5637 细胞 24 h 后 MMP 变化
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Changes in MMP levels in 5637 cells after 24 h treatment with different drugs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物	红/绿荧光强度	药物	红/绿荧光强度
对照	6.27 ± 0.81***	Ce6-L	1.21 ± 0.08**
Ee+Ce6	3.41 ± 0.21***	Ee-Ce6-L	0.38 ± 0.02

0.001)。

2.5.5 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 分析 采用 Western blotting 实验测定凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、cleaved PARP 和 cleaved Caspase-3 的表达。收集细胞，并在含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 (RIPA lysis buffer, RIPA) 中裂解；采用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶对总蛋白进行分离；然后进行转膜，用含 5% 脱脂奶粉封闭，加入一抗在 4 °C 过夜。用 TBST 清洗 5 次后，加入二抗于室温孵育 1 h，加入化学发光检测试剂进行显色。结果如图 9 及表 11 所示，相较于对照组，药物处理组降低了 Bcl-2 蛋白的表达并提高了 Bax、cleaved PARP 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达，表明 Ee+Ce6、Ce6-L 及 Ee-Ce6-L 均能通过线粒体途径诱导细胞凋亡。与 Ee+Ce6 组相比，Ee-Ce6-L 能显著降低 Bcl-2 蛋白表达并显著提升 Bax、cleaved PARP 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达，表明脂质体的包封能够更有效的将药物递送至肿瘤细胞中。与

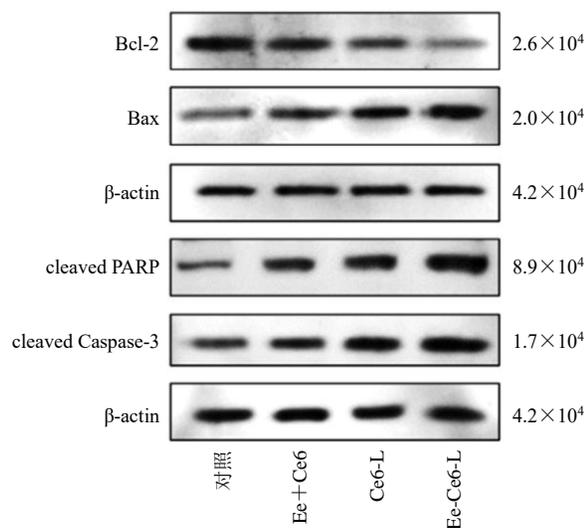


图 9 不同药物对 5637 细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved PARP 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平的影响

Fig. 9 Effects of different drugs on expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved PARP and cleaved Caspase-3 proteins in 5637 cells

Ce6-L 相比，Ee-Ce6-L 能显著降低 Bcl-2 蛋白表达并显著提升 Bax、cleaved PARP 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达，表明将榄香烯及 Ce6 共载于脂质体中后具有较好的协同作用，能够有效诱导细胞凋亡。

3 讨论

膀胱癌作为全球范围内最常见的癌症之一，发病率居高不下，死亡率占相关癌症死亡的 2.1% 左右。PDT 因其微创与低毒特性，在浅表性膀胱癌治疗中

表 11 不同药物对 5637 细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved PARP 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 11 Effects of different drugs on expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved PARP, and cleaved Caspase-3 proteins in 5637 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	蛋白表达水平			
	Bax	Bcl-2	cleaved Caspase-3	cleaved PARP
对照	0.57±0.09***	0.85±0.06***	0.49±0.12***	0.29±0.06***
Ee+Ce6	0.71±0.07**	0.64±0.08***	0.81±0.15**	0.48±0.13**
Ce6-L	0.86±0.03**	0.35±0.02**	0.99±0.04*	0.69±0.17*
Ee-Ce6-L	1.14±0.05	0.13±0.01	1.31±0.07	1.05±0.18

展现出潜力^[21]。Ce6 作为 FDA 批准的第 2 代光敏剂,能够穿透到较深的组织且能迅速排出体外,但 Ce6 亲水性较差,在生理条件下易聚集,体内清除速度快,并且对肿瘤组织的靶向性有限。榄香烯作为广谱抗癌中药活性成分,尽管具有多靶点抑瘤活性,但同样存在疏水性强且稳定性差的问题^[22]。脂质体作为经典的药物递送载体,凭借良好的生物相容性、可修饰性强等特点广泛应用于抗肿瘤药物递送系统的构建。但传统脂质体存在药物释放缺乏特异性、易被网状内皮系统清除等缺陷^[23]。针对上述问题,本研究通过将榄香烯与 Ce6 共载于光控 ROS 响应脂质体中,旨在提升两药的生物利用度并实现协同抗肿瘤作用。

本研究首先通过 MTT 实验筛选出榄香烯和 Ce6 的协同比例(120:1),在此基础上制备脂质体,确保了 Ee-Ce6-L 在细胞水平发挥最大的协同增效作用。现有的刺激响应型脂质体多依赖 pH 值、温度、酶等内源性触发信号,但这些信号在不同肿瘤组织或同一肿瘤不同区域中存在显著异质性^[24]。例如,肿瘤组织的酸性程度并非恒定,酶表达受到肿瘤分型和进展阶段影响,导致响应行为可能不稳定或触发不充分^[25]。这一限制使内源性刺激响应脂质体在实际应用中难以实现准确且可控的药物释放。相比于利用肿瘤微环境的 pH 值响应或酶响应脂质体,光控释药脂质体能够更精准地控制药物释放的时机和区域。因此,本研究提出了光控 ROS 响应脂质体,通过外源激光精确控制药物释放,克服了内源性信号异质性带来的释放不可控问题。其核心设计在于选择不饱和磷脂 PC-98T 作为膜材之一。PC-98T 含有单烯丙基氢^[26],能与经 660 nm 激光照

射后 Ee-Ce6-L 产生的大量 ROS 发生氧化反应,导致脂质亲水性增强,破坏了维持脂质体完整性的疏水分子间的连接,从而使得榄香烯和 Ce6 可控释放。此外,DSPE-PEG₂₀₀₀ 的引入在脂质体表面形成致密的构象云,既减少脂质体间的聚集与融合,又避免了药物的非特异性渗漏^[27]。

MTT 结果显示,Ee-Ce6-L 细胞毒性最强,且 CI 值小于 1,证实了榄香烯与 Ce6 在脂质体中共载后具有明确的协同抗肿瘤效应。Annexin V-FITC/PI 双染实验结果显示 Ee-Ce6-L 诱导细胞凋亡能力最强。在 PDT 治疗肿瘤过程中,ROS 在破坏肿瘤组织方面发挥着决定性的作用,ROS 水平的升高表明对肿瘤细胞的杀伤力增强,而 MMP 降低则是细胞凋亡过程中最早发生的标志^[28]。实验结果表明,Ee-Ce6-L 在 660 nm 激光照射下能够产生大量 ROS 和降低 MMP,且 ROS 产生和 MMP 降低程度高于其他实验组,表明 Ee-Ce6-L 能够通过增加 ROS 的产生和降低 MMP 促进细胞凋亡。Western blotting 实验结果显示,5637 细胞经 Ee-Ce6-L 处理后,抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著下调,促凋亡蛋白 Bax 表达上调,进而激活了 Caspase 级联反应,cleaved Caspase-3 及 cleaved PARP 表达显著增加,从分子水平证明 Ee-Ce6-L 能够通过线粒体通路诱导细胞凋亡。

综上所述,本研究成功制备了具有稳定性好,包封率高的脂质体(Ee-Ce6-L)。Ee-Ce6-L 不仅具有良好的理化性质和光控释 ROS 响应特性,还能通过“中药-光疗”作用诱导膀胱癌 5637 细胞凋亡,为膀胱癌治疗提供了新策略。本研究目前主要集中于体外细胞水平的验证,缺乏 Ee-Ce6-L 的体内药效、生物分布及长期安全性评价。后续研究将进一步评估 Ee-Ce6-L 的抑瘤效果及全身毒性。此外,PDT 疗效高度依赖氧分子的参与,而实体瘤内部常处于乏氧状态,可能限制 ROS 的生成效率及脂质体的响应性释放,未来将考虑在载体中引入供氧剂以增强疗效。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Zhuang X X, Ma X W, Xue X D, *et al.* A photosensitizer-

- loaded DNA origami nanosystem for photodynamic therapy [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(3): 3486-3495.
- [3] Zhang Y K, Zhang H, Zou Q L, *et al.* An injectable dipeptide-fullerene supramolecular hydrogel for photodynamic antibacterial therapy [J]. *J Mater Chem B*, 2018, 6(44): 7335-7342.
- [4] Adimoolam M G, Vijayalakshmi A, Nalam M R, *et al.* Chlorin e6 loaded lactoferrin nanoparticles for enhanced photodynamic therapy [J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5(46): 9189-9196.
- [5] Liu Y W, Xu S T, Lyu Q Y, *et al.* Ce6 nanoassemblies: Molecular mechanism and strategies for combinational anticancer therapy [J]. *Aggregate*, 2024, 5(1): e443.
- [6] Xie Z J, Fan T J, An J, *et al.* Emerging combination strategies with phototherapy in cancer nanomedicine [J]. *Chem Soc Rev*, 2020, 49(22): 8065-8087.
- [7] 翟秉涛, 田欢, 孙静, 等. 榄香烯及 β -榄香烯抗肿瘤靶向药物递送系统的研究进展 [J]. *中成药*, 2023, 45(6): 1921-1928.
- [8] 麻杰, 陈娟, 赵冰洁, 等. 抗癌药物 β -榄香烯及其衍生物的研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(5): 1184-1191.
- [9] Tan T T, Li J, Luo R H, *et al.* Recent advances in understanding the mechanisms of elemene in reversing drug resistance in tumor cells: A review [J]. *Molecules*, 2021, 26(19): 5792.
- [10] Gan D J, He W Y, Yin H B, *et al.* β -elemene enhances cisplatin-induced apoptosis in bladder cancer cells through the ROS-AMPK signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1): 291-300.
- [11] 阮明月, 吴凯, 周占荣, 等. 聚单宁酸包覆的 PLGA 纳米粒装载 β -榄香烯用于光热-化疗联合抗肿瘤的研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(23): 7353-7360.
- [12] Han N, Shi Q, Wang X R, *et al.* Liposome co-loaded with β -elemene and IR780 for combined chemo-phototherapy [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 68: 103122.
- [13] 翟秉涛, 田欢, 孙静, 等. ATF24 多肽修饰的 β -榄香烯脂质体联合顺铂对膀胱癌 5637 细胞的协同增效作用 [J]. *中国药理学杂志*, 2023, 58(6): 506-515.
- [14] Alqosaibi A I. Nanocarriers for anticancer drugs: Challenges and perspectives [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2022, 29(6): 103298.
- [15] Chou T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440-446.
- [16] Zhang X L, Mei W, Guo D Y, *et al.* Preparation of photo-controlled release ROS-responsive Ce6/elemene co-loaded liposomes and study on the effect on enhancing apoptosis of NMIBC [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 179: 117398.
- [17] 董博宇. β -榄香烯-姜黄素复方脂质体的制备与联用多西他赛抗肿瘤作用的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [18] 田文源, 陈飞虹. IDO1 抑制剂联合替莫唑胺对人脑胶质瘤的协同抗肿瘤作用研究 [J]. *药学报*, 2022, 57(3): 707-715.
- [19] Kim H, Xue X. Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining [J]. *J Vis Exp*, 2020(160): e60682.
- [20] 陈卓, 秦昆, 何玥颖, 等. TRPV4 在心肌细胞缺氧损伤中的作用及机制研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(7): 1194-1200.
- [21] Ouyang W R, Wang H, Zhao Z J, *et al.* Light-responsive Ru-Se coordinated nanoreactor spatiotemporally relieves hypoxia for photodynamic therapy of bladder cancer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2025, 17(20): 29392-29406.
- [22] Zhai B T, Zhang N N, Han X M, *et al.* Molecular targets of β -elemene, a herbal extract used in traditional Chinese medicine, and its potential role in cancer therapy: A review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108812.
- [23] Maddiboyina B, Ramaiah, Nakkala R K, *et al.* Perspectives on cutting-edge nanoparticulate drug delivery technologies based on lipids and their applications [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2023, 102(2): 377-394.
- [24] Zhang W, Kohane D S. Keeping nanomedicine on target [J]. *Nano Lett*, 2021, 21(1): 3-5.
- [25] Lee Y, Thompson D H. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2017, 9(5). DOI:10.1002/wnan.1450.
- [26] Rwei A Y, Lee J J, Zhan C Y, *et al.* Repeatable and adjustable on-demand sciatic nerve block with phototriggerable liposomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(51): 15719-15724.
- [27] Yamazoe E, Fang J Y, Tahara K. Oral mucus-penetrating PEGylated liposomes to improve drug absorption: Differences in the interaction mechanisms of a mucoadhesive liposome [J]. *Int J Pharm*, 2021, 593: 120148.
- [28] Ming L, Cheng K, Chen Y, *et al.* Enhancement of tumor lethality of ROS in photodynamic therapy [J]. *Cancer Med*, 2021, 10(1): 257-268.

[责任编辑 郑礼胜]