

## 光敏感型盐酸多柔比星脂质体逆转乳腺癌耐药

孟庆硕<sup>1,2</sup>, 张鹏程<sup>1</sup>, 尹琦<sup>1</sup>, 张志文<sup>1</sup>, 于海军<sup>1</sup>, 李亚平<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 本文旨在构建一种新型光敏感共输送脂质体, 联合光动力学治疗与化疗, 逆转乳腺癌耐药。采用薄膜水化挤出-硫酸铵主动载药法制备共输送光敏剂二氢卟吩 e6 三甲酯 (chlorin e6 trimethyl ester, Ce6tM) 与盐酸多柔比星 (doxorubicin hydrochloride, DOX) 的脂质体 (liposomes loaded with Ce6tM and DOX, CDL), 对 CDL 的粒径、zeta 电位、光敏感释药行为及释药机制进行了研究。在此基础上, 进一步考察该脂质体对人乳腺癌耐阿霉素 MCF7/ADR 细胞的细胞毒性、摄取、胞内三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 水平和细胞周期的影响。最后探究了 CDL 中 DOX 在荷 MCF7/ADR 肿瘤裸鼠中的组织分布和抗肿瘤效果。结果表明, CDL 具有良好的光敏感释药特性, 在 671 nm ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) 激光照射过程中, 2 min 内 DOX 的累积释放就达到  $(96.52 \pm 0.11)\%$ 。低功率、短时间 ( $15 \text{ s}$ ,  $0.25 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) 光照后, CDL 中 DOX 仍可继续快速释放。这种光敏感释药行为有助于增加 DOX 在 MCF7/ADR 细胞中的蓄积。与未光照组比较, 光照 CDL 组中 DOX 对 MCF7/ADR 细胞的半数抑制浓度 (inhibitory concentration 50,  $\text{IC}_{50}$ ) 降低了 601.9 倍, 这可能与肿瘤细胞内 DOX 的蓄积增加、单线态氧 (singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ ) 产生、ATP 水平下降以及细胞周期的阻滞有关。药效学实验结果表明, 光照 CDL 组的肿瘤抑制率达到  $(94.7 \pm 6.2)\%$ 。光敏感 CDL 在逆转乳腺癌耐药治疗方面具有明显的潜在应用价值。

**关键词:** 乳腺癌; 多柔比星; 耐药; 脂质体; 光动力学治疗; 光敏感

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 05-0809-12

## Photo-sensitive liposomes loading doxorubicin hydrochloride reverse drug resistance of breast cancer

MENG Qing-shuo<sup>1,2</sup>, ZHANG Peng-cheng<sup>1</sup>, YIN Qi<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-wen<sup>1</sup>, YU Hai-jun<sup>1</sup>, LI Ya-ping<sup>1\*</sup>

(1. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** This study was aimed to build a new photo-sensitive co-delivery liposomes which combine photodynamic therapy with chemotherapy to reverse drug resistance of breast cancer. Photodynamic photosensitizer chlorin e6 trimethyl ester (Ce6tM) and chemotherapeutic drug doxorubicin hydrochloride (DOX) were loaded into the liposomes (liposomes loaded with Ce6tM and DOX, CDL) by thin-film hydration extrusion and ammonium sulfate active loading methods. CDL was characterized with cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM), dynamic light scattering particle size, zeta potentials and photo-sensitive DOX release behaviors *in vitro*. CDL cytotoxicity, singlet oxygen production, DOX accumulation, intracellular ATP level and cell cycle analysis in MCF7/ADR cells were evaluated. Finally, the tissue distribution of DOX and antitumor effects of CDL in BALB/c-nu nude mice bearing MCF7/ADR tumor were investigated. The results showed that the particle size of obtained CDL was  $90.7 \pm 1.1 \text{ nm}$  and distributed uniformly. CDL possessed outstanding properties of

收稿日期: 2017-02-03; 修回日期: 2017-02-21.

基金项目: 国家自然科学基金创新研究群体项目 (81521005).

\*通讯作者 Tel: 86-21-20231979, E-mail: ypli@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0105

photo-sensitive drug release profile. The accumulated release of DOX reached ( $96.52 \pm 0.11$ ) % in 2 min under 671 nm laser irradiation ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Interestingly, DOX in CDL could maintain rapid release after 671 nm laser irradiation with low power and short time ( $15 \text{ s}$ ,  $0.25 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). This phenomenon was caused by oxidation of unsaturated phospholipids in CDL under 671 nm laser irradiation and had nothing to do with the slightly elevated temperature. Photo-sensitive drug release behavior contributed to increased DOX accumulation in MCF7/ADR cells. The half inhibition concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of DOX in CDL laser group in MCF7/ADR cells was decreased by 601.9-fold compared with no laser group, which could be related to increased accumulation of DOX, decreased ATP levels and cell cycle arrest in MCF7/ADR cells. With the help of CDL, DOX accumulation in tumor was increased and in cardiac toxicity was reduced *in vivo*. CDL laser group showed a good anti-tumor effect. The tumor inhibition rate was ( $94.7 \pm 6.2$ )%. These results suggest that CDL has a promising potential in reversing drug resistance of breast cancer.

**Key words:** breast neoplasm; doxorubicin; drug resistance; liposome; photodynamic therapy; photo-sensitive

2015 年我国新增癌症患者约 429 万, 癌症发病形势严峻。其中, 乳腺癌位居女性癌症发病率之首, 约占所有女性癌症的 15%<sup>[1, 2]</sup>。肿瘤耐药现象的发生是导致乳腺癌临床治疗失败的主要原因之一。导致肿瘤细胞耐药的机制主要包括药物摄取减少与外排增加、DNA 损伤修复机制改变、细胞解毒系统活性升高、凋亡途径失活及药物作用靶点的改变等<sup>[3, 4]</sup>。联合多种治疗手段, 从不同作用机制出发逆转肿瘤耐药是目前的研究热点之一, 主要包括化疗、靶向治疗、基因治疗、光动力学治疗和光热力学治疗等<sup>[5-10]</sup>。借助于纳米技术, 能够将不同药理活性的药物包载到同一药物输送系统中, 实现多种治疗手段的融合, 更好地发挥协同效应<sup>[11]</sup>。其中, 光敏感纳米药物共输送系统有着独特的优势<sup>[12]</sup>, 首先, 光是一种非侵入无创或微创的外源性刺激, 患者顺应性较好, 并且在一定程度上避免了内源响应性药物输送系统在肿瘤患者中应用时的个体差异; 其次, 能够在时间、空间和强度上对激光进行精确控制, 减少不良反应的发生。据报道, 脂质体在经过直径约 1 cm 的肿瘤时, 其经过肿瘤组织内部血管的最短滞留时间仅为  $50 \sim 100 \text{ s}$ <sup>[13, 14]</sup>, 因此, 设计制备快速光响应的药物输送系统尤为必要。此外, 光疗过程中激光的强度会随着穿透组织深度的增加而锐减<sup>[15]</sup>, 进而削弱了药物对较深部位肿瘤组织的治疗效果。改善低功率、短时间光疗的效果也是亟待解决的科学问题之一。

本文以二氢卟吩 e6 三甲酯 (Ce6tM) 为光敏剂, 盐酸多柔比星 (DOX) 作为化疗药物, 大豆磷脂 (soybean phospholipid, SPC) 脂质体为载体, 构建了一个制备过程简单、可以光敏感快速释放化疗药物的药物输送系统, 为解决光疗过程中遇到的困难, 更好地逆转乳腺癌耐药提供了一定的研究基础。在该药物输送系统中, 亲脂性的 Ce6tM 嵌入在脂质体的磷脂

双分子层中, 亲水性药物 DOX 则位于脂质体的内水相中。在激光照射过程中, Ce6tM 发生光动力学反应, 产生  $^1\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$  直接作用于磷脂双分子层, 氧化破坏 SPC, 增强脂质体磷脂双分子层的通透性, 快速释放药物, 在局部达到一个较高的药物浓度, 增加 DOX 在肿瘤细胞中的蓄积和细胞毒性。在光照后, 由于脂质体膜的氧化破坏是不可逆的, 滞留在肿瘤微环境或肿瘤细胞内的脂质体仍然可以继续较快地释放药物, 即使在低功率、短时间的光照后, 该释放行为依然存在。这有助于增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 改善低功率、短时间光照的治疗效果。此外, 光动力学可以从不同的机制出发杀死肿瘤细胞, 在治疗效果上与化疗药物 DOX 形成互补, 更好地逆转乳腺癌耐药。

## 材料与amp;方法

**材料与试剂** DOX、氨苄霉素和硫酸链霉素 (大连美仑生物技术有限公司); Ce6tM (和光纯药工业株式会社); S100 型大豆磷脂酰胆碱 (SPC, 德国 Lipoid 公司); 胆固醇、DSPE-PEG<sub>2000</sub> (上海艾韦特医药科技有限公司); ProElut PLS SPE 固相萃取小柱 (30 mg, 1 mL, 上海迪柯马分析技术有限公司); 脂质氧化检测试剂盒、Hoechst 33342、活性氧检测试剂盒和增强型 ATP 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 单线态氧绿色探针 (singlet oxygen sensor green, SOSG)、1640 干粉培养基、0.25% 胰蛋白酶消化液和胎牛血清 (美国 Life Technology 公司); 细胞毒性检测试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK8, 上海翊圣生物科技有限公司); 其他试剂均为分析纯。

**仪器** 脂质体挤出器 (LiposoFast LF1, Avestin, Canada); 红外激光器 (MRL-FN-671, 长春新产业光电技术有限公司); 酶标仪 (Enspire, PerkinElmer,

USA); 快速冷冻制样机 (Vitrobot, FEI, USA); 场发射冷冻透射电镜 (TF20, FEI, USA); 粒度和 zeta 电位分析仪 (Zetasizer Nano ZS90, Malvern, UK); 红外热成像仪 (AI50-15-M, 明和电子企业有限公司); 倒置荧光显微镜 (TH4-200, Olympus, Japan); 流式细胞仪 (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA); 组织匀浆仪 (Precellys 24, Bertin technology, France)。

**细胞** 人乳腺癌细胞株 MCF7 购自中国科学院上海细胞库; 人乳腺癌耐阿霉素细胞株 MCF7/ADR 购自上海博谷生物科技有限公司。二者均采用含有 10% 胎牛血清的完全 1640 培养基培养, 其中 MCF7/ADR 细胞培养基中加入化疗药物 DOX 维持细胞的耐药性, 终质量浓度为  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**动物** BALB/c-nu 裸鼠 (18~20 g, 雌性, 合格证号: 2013001822795) 购自中国科学院上海实验动物中心, 置于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 h 光-暗交替的环境下饲养, 动物可自由饮水及取食。所有实验动物的相关操作均按照中国科学院上海药物研究所实验动物管理和使用委员会的相关要求进行。荷 MCF7/ADR 肿瘤的裸鼠动物模型的建立方法: 取 BALB/c-nu 裸鼠, 于右侧腋窝第三对乳腺脂肪垫皮下接种 MCF7/ADR 细胞, 每只裸鼠接种  $1\times 10^7$  个细胞。

**CDL 的制备** 采用薄膜水化-硫酸铵主动载药法制备共输送 Ce6tM 与 DOX 的脂质体 CDL。称取 SPC、胆固醇、DSPE-PEG<sub>2000</sub> 和 Ce6tM (质量比 70 : 17.5 : 10 : 3), 溶解于甲醇/二氯甲烷混合溶剂 (体积比 9 : 1),  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  旋转蒸发成膜,  $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫酸铵溶液水化得到初乳。置于挤出器中, 过 50 nm 聚碳酸酯膜 15 次, 去离子水透析。加入 15% 质量比的 DOX,  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴孵育 10 min, 过葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱, 除去未被包载的 DOX, 得到 CDL。空白脂质体 (blank liposomes, SBL)、单载 DOX 的脂质体 (liposomes loaded with DOX, SDL)、单载 Ce6tM 的脂质体 (liposomes loaded with Ce6tM, SCL) 和 SDL 与 SCL 的物理混合物 (SDL+SCL mixture) 的制备方法与 CDL 类似, 不同之处在于处方中不加 DOX 或 Ce6tM。

**CDL 的处方筛选** 采用上述方法, 分别改变 Ce6tM 的比例 (质量比 0%、0.25%、0.5%、1% 和 3%), 胆固醇与 SPC 的比例 (质量比 1 : 2、1 : 4、1 : 8 和 0), 制备不同处方的 CDL。以  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴处理 6 h 和  $2\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$  671 nm 激光照射 1 min 后 DOX 的释放情况作为考察条件, 筛选最优处方。检测最优处方 CDL 中 DOX 的封装率。

**DOX 释放检测** 用 PBS (pH 7.4) 将 CDL 或 SDL 中 DOX 稀释至  $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 经过不同处理后 ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 671 nm 激光光照或水浴孵育), 利用固相萃取小柱检测 DOX 的释放百分比。

**粒径与 zeta 电位** 用马尔文粒度测定仪检测 CDL 在室温 PBS (pH 7.4) 中的粒径和 zeta 电位。

**冷冻透射电镜 (cryo-transmission electron microscopy, Cryo-TEM)** 将 CDL 脂质总质量浓度稀释至  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 采用 FEI Vitrobot 快速冷冻机制样, 上样量  $3\text{ }\mu\text{L}$ , 吸附力度为 -1, 吸附时间为 4.5 s。圆孔碳支持膜铜网事先经过 10 s 亲水化处理。Tecnai TF20 200 kV 透射电镜拍摄观察 CDL 形态。

**光热效应考察** 取 DOX 质量浓度为  $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CDL、SDL 或  $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  SCL 置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴中, 671 nm 激光照射, 红外热成像仪实时监测溶液温度变化。

**$^1\text{O}_2$  的检测** 将 CDL 或 SCL 中 Ce6tM 稀释至  $95\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 加入 SOSG 甲醇溶液, 使其终浓度为  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴, 不同功率 671 nm 激光照射不同时间, 酶标仪检测溶液的荧光强度值 ( $E_x/E_m = 504/525\text{ nm}$ )。另考察 CDL 在  $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  中的  $^1\text{O}_2$  产生情况。

**磷脂氧化产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的检测** 采用脂质氧化检测试剂盒考察脂质体光照后产物中 MDA 的产生情况。由于试剂盒的荧光检测条件与 DOX 较为接近, 因此没有设置含 DOX 各脂质体处方的实验组。将 SCL 中 Ce6tM 稀释至  $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴中, 不同功率 671 nm 激光照射不同时间。按照试剂盒说明书处理后, 酶标仪检测荧光强度值 ( $E_x/E_m = 535/553\text{ nm}$ ), 计算 MDA 浓度。

**DOX 细胞内蓄积** 定量检测 DOX 细胞内蓄积的方法: 将 MCF7/ADR 细胞以  $8\times 10^4$  个/孔接种到 24 孔培养板中,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h。分别加入游离 DOX、SDL、CDL 和 SDL+SCL 混合物, DOX 终质量浓度为  $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Ce6tM 终质量浓度为  $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 避光孵育 1、2、4、8 和 12 h。光照组 12 h 后于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $2\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 671 nm 激光光照 2 min, 光照后尽快用流式细胞仪 FL-2 通道检测各组细胞中 DOX 的平均荧光强度值。采用类似方法另考察低功率、短时间下 671 nm 激光光照 ( $0.25\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 15 s) 对 CDL 中 DOX 胞内蓄积的影响, 不同之处在于激光的功率、光照时间及孵育时间 (12 h 和 18 h)。定性观察 DOX 细胞内蓄积的方法如下, 按照前面所述制备好不同时间点的细胞样品, 每孔加入  $6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Hoechst 33342 染料  $1\text{ }\mu\text{L}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min, 标记细胞

核。0.4%台盼蓝的 PBS 淬灭细胞表面吸附的荧光药物,冷 PBS 洗涤 2 次,荧光显微镜定性观察细胞内 DOX 的蓄积分布情况 (FL1 和 FL4 通道)。

**细胞毒性** 将 MCF7、MCF7/ADR 细胞分别以  $4 \times 10^3$  个/孔接种到 96 孔培养板中,培养 24 h。加入不同浓度的游离 DOX、SDL、SCL、CDL 和 SDL+SCL 混合物 (DOX 与 Ce6tM 质量比为 5:1),另设空白对照组。37 °C 避光培养 12 h 后,光照组在 37 °C 下 671 nm ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 2 min) 激光照射,继续避光孵育 36 h。采用 CCK8 法检测各脂质体对 MCF7 和 MCF7/ADR 细胞的细胞毒性。将浓度的对数值与细胞存活率用 GraphPad Prism 软件拟合,计算各制剂的  $\text{IC}_{50}$  值。另采用类似方法考察低功率、短时间 671 nm 激光光照 ( $0.25 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 15 s) 下 CDL、SCL 和 SDL 对 MCF7/ADR 细胞细胞毒性的影响。

**细胞内  $^1\text{O}_2$  检测** 利用活性氧检测试剂盒检测 CDL 等在细胞内  $^1\text{O}_2$  的产生。将 MCF7/ADR 细胞以  $8 \times 10^4$  个/孔接种到 24 孔培养板中,培养 24 h 后,分别加入游离 DOX、SDL、SCL、CDL 和 SDL+SCL 混合物,DOX 终质量浓度为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Ce6tM 终质量浓度为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,另设空白对照组。避光孵育 12 h 后移去含有药物的培养基, PBS 洗涤两次,加入  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  2,7-二氯荧光素二乙酸酯工作液 0.5 mL, 37 °C 避光孵育 30 min, 装载探针。将光照组细胞用 671 nm 激光 ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 2 min) 照射。冷 PBS 洗涤 2 次,消化,离心收集细胞,流式细胞仪 FL-1 通道检测。

**细胞内 ATP 水平检测** 将 MCF7/ADR 细胞以  $1.5 \times 10^5$  个/孔接种到 12 孔培养板中,培养 24 h 后,加入游离 DOX、SDL、SCL、CDL 和 SDL+SCL 混合物 (DOX 终质量浓度为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Ce6tM 终质量浓度为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 设空白对照组,避光孵育 12 h,将光照组细胞用 671 nm 激光 ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 2 min) 照射,继续避光孵育 12 h。根据 ATP 检测试剂盒使用说明书制备样品,检测各实验组细胞内 ATP 水平。

**细胞周期** 将 MCF7/ADR 细胞以  $1.5 \times 10^5$  个/孔接种到 12 孔培养板中,培养 24 h 后,加入游离 DOX、SDL、SCL、CDL 和 SDL+SCL 混合物 (DOX 终质量浓度为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Ce6tM 终质量浓度为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 设空白对照组,避光孵育 12 h,将光照组细胞用 671 nm 激光 ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 2 min) 照射,继续避光孵育 12 h。消化离心收集细胞,冷 PBS 洗涤 2 次。用冷 PBS 0.3 mL 重悬细胞,边涡旋边缓慢加入无水乙醇 0.7 mL, 4 °C 固定过夜。离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次,向细胞悬液中加入  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  RNase A 2  $\mu\text{L}$  及  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

碘化丙啶 5  $\mu\text{L}$ , 37 °C 避光孵育 30 min,流式细胞仪 FL-2A 通道检测 MCF7/ADR 细胞的细胞周期分布情况。

**DOX 体内分布** 取荷 MCF7/ADR 肿瘤的 BALB/c-nu 裸鼠 42 只,随机分为 7 组 (游离 DOX 组、SDL 组、SDL 光照组、CDL 组、CDL 光照组、SDL+SCL 混合物组和 SDL+SCL 混合物光照组),每组每个时间点 3 只。经尾静脉给予 DOX 剂量为  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的制剂。其中光照组在给药 4 h 后,对肿瘤给予 671 nm 激光照射 (2 min  $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ )。给药后 4 和 24 h 处死裸鼠,取心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织称重,置于组织匀浆管中,按  $2 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$  比例加入 DMSO,匀浆后离心取上清液,酶标仪检测各个组织中 DOX 浓度 ( $E_x/E_m=485/590 \text{ nm}$ )。

**药效学评价** 取荷 MCF7/ADR 肿瘤的 BALB/c-nu 裸鼠 40 只,随机分为 8 组,每组 5 只。设生理盐水组、游离 DOX 组、SCL 组、SDL 组、CDL 组、SCL 光照组、CDL 光照组和 SDL+SCL 混合物光照组。经尾静脉给药,给药剂量为 DOX  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Ce6tM  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。每 4 天给药 1 次,共给药 3 次。光照组在给药 4 h 后对肿瘤给予 671 nm 激光照射 (2 min,  $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ )。给药期间,每 2 天用游标卡尺测量肿瘤的最大直径 ( $L_{\text{major axis}}$ ) 和最小直径 ( $L_{\text{minor axis}}$ ),计算肿瘤体积 ( $V$ ),公式如下:

$$V_{\text{Tumor}} = \frac{L_{\text{Major axis}} \times L_{\text{Minor axis}}^2}{2}$$

然后分别与各组裸鼠第 1 天的肿瘤体积值相比,计算相对肿瘤生长速率。实验结束后,用戊巴比妥钠将各组裸鼠麻醉,并拍照。CO<sub>2</sub> 窒息法将裸鼠处死,小心完整地取出裸鼠体内肿瘤组织,清洗后拍照称重。按照如下公式计算肿瘤抑制率 (tumor inhibiting rate, TIR):

$$\text{TIR} = \left(1 - \frac{W_{\text{test}}}{W_{\text{saline}}}\right) \times 100\%$$

其中,  $W_{\text{saline}}$  表示生理盐水组裸鼠肿瘤的平均重量,  $W_{\text{test}}$  表示各制剂组裸鼠肿瘤的平均重量。

**CDL 的初步生物安全性评价** 取正常 BALB/c-nu 裸鼠 6 只,按照药效学评价中生理盐水组、游离 DOX 组、SCL 组、SDL 组、CDL 组和 CDL 光照组的方案给药,在第 14 天时,经 CO<sub>2</sub> 窒息法处死,小心取出心、肝、脾、肺和肾组织,置于 4% 多聚甲醛中固定,乙醇-二甲苯脱水,石蜡包埋,切片。之后用二甲苯彻底脱蜡。用梯度的乙醇水溶液 (100%、95%、75%、0%) 和 PBS (pH 7.4) 复水化。苏木精和伊红

(hematoxylin and eosin, H&E) 染色, 显微镜下观察拍照。

**统计学方法** 实验数据均以均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行方差齐性检验, 两组样本之间比较采用 *t* 检验, 多组间采用单因素方差分析。显著性结果以 \* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  和 \*\*\* $P < 0.001$  表示。

## 结果与讨论

### 1 CDL 处方的筛选与表征

37 °C 孵育 6 h 后不同处方脂质体中 DOX 释放结果见图 1A。Ce6tM 载药量在 0.25%~3% 时对 DOX 的释放速度影响不大。SPC 与胆固醇的比例影响较大, 当二者比例为 1:8 时, 6 h 内释放 DOX 速度明显加快, 表明一定范围内胆固醇比例的提高有利于脂质体稳定。从图 1B 结果可以看出, Ce6tM 载药量的增加、胆固醇比例的降低有助于加快脂质体中 DOX 在光照条件下的释放。此外还发现, 如果 Ce6tM 的质量比继续提高至 5%, 此时磷脂膜的刚性增强, 挤出法制备工艺难度增加, 同时得到的 CDL 稳定性大大降低, 室温放置 36 h 后会有 Ce6tM 析出 (数据未列出)。为了兼顾 CDL 在 37 °C 条件下的稳定性和光敏感释药特性, 选择 Ce6tM 载药量 3%, 胆固醇与大豆磷脂质量比 1:4 为最终的制剂处方。

经检测, 最佳处方的 CDL 中 DOX 的包封率为 (99.7 $\pm$ 1.5)%。利用冷冻透射电镜观察到 CDL 呈圆球形, 较均一, 粒径在 90 nm 左右 (图 1C)。因为 DOX 为亲水性药物, 位于脂质体内水腔, 在冰冻状态下形

成结晶而呈棒状。采用动态光散射的方法检测到 CDL 在 PBS (pH 7.4) 中粒径为 90.7 $\pm$ 1.1 nm, 多分散指数为 0.130 $\pm$ 0.019, 与透射电镜结果一致 (图 1D)。Zeta 电位呈近中性, 为 -1.5 $\pm$ 0.6 mV。CDL 表面的中性电荷, 有助于其躲避网状内皮系统的识别, 延长其体内循环时间, 增强抗肿瘤效果。

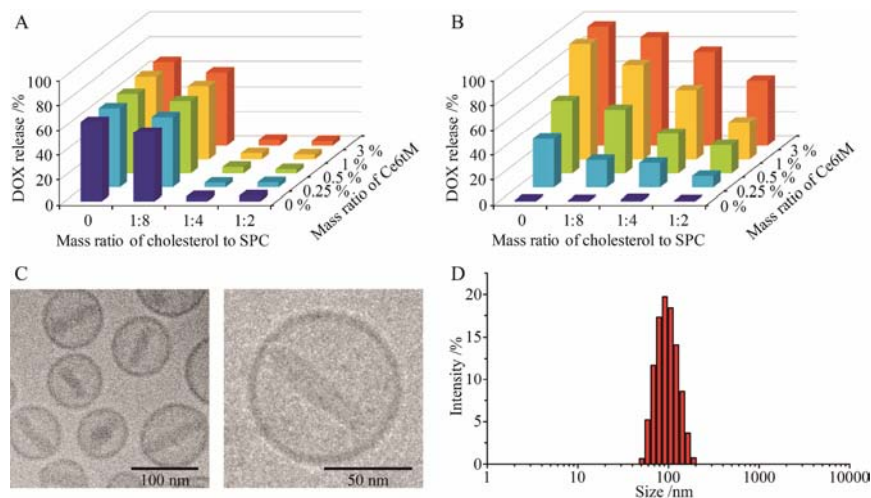
### 2 DOX 的光敏感释放

CDL 在不同功率 671 nm 激光照射过程中 DOX 的累积释放情况如图 2A 所示。CDL 中 DOX 的释放速度与激光功率呈正相关。在未光照条件下, 4 min 内 CDL 中 DOX 几乎无释放。当激光功率提高 4 W·cm<sup>-2</sup> 时, DOX 在 1 min 内释放达到了 (94.1 $\pm$ 1.8)%。然而相同条件下, SDL 组 DOX 几乎没有释放, 与未光照 CDL 组没有显著性差异, 表明 Ce6tM 赋予了 CDL 光敏感释药特性。

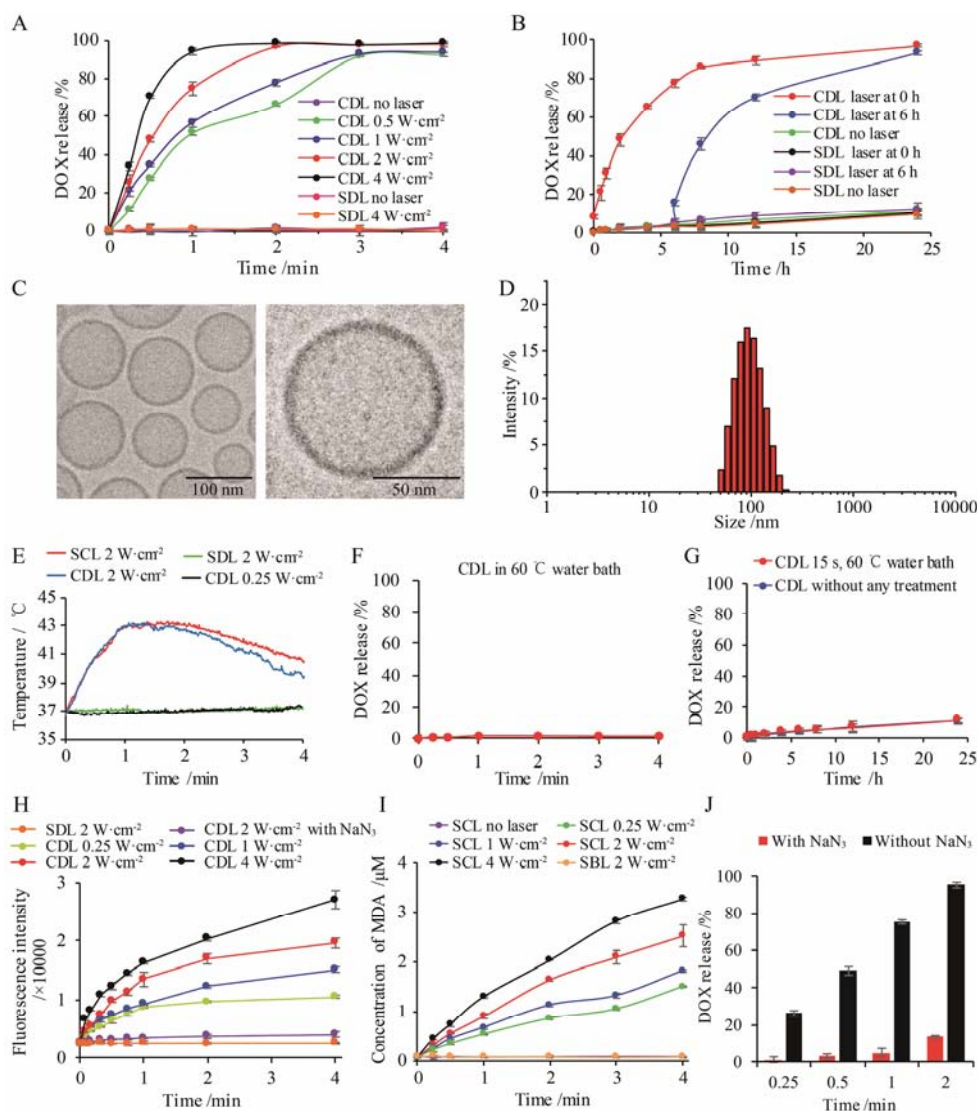
短时间、较低功率光照后 CDL 中 DOX 释放结果见图 2B。CDL 在经过 671 nm 激光 (15 s, 0.25 W·cm<sup>-2</sup>) 光照后, DOX 突释 8% 左右, 之后虽然不再有激光照射, 但是该组 CDL 中 DOX 的释放速度明显快于未光照 CDL 组。在 24 h, 该组 DOX 释放接近完全 [(97.0 $\pm$ 1.0)%], 而未光照 CDL 组仅释放了 11.1%。调整激光光照的时间点至 6 h, 观察到类似的现象。然而同样条件的激光照射对 SDL 组中 DOX 的释放速度均没有影响, 表明短时间、低功率的光照可能导致了 CDL 磷脂双分子层通透性不可逆的改变, 加速了光照后 CDL 中 DOX 药物的释放。

### 3 光敏感释药机制

为了考察 CDL 光敏感释药机制, 首先利用冷冻



**Figure 1** Formulation screening of liposomes loaded with chlorin e6 trimethyl ester (Ce6tM) and doxorubicin hydrochloride (DOX) (CDL). Percentages of DOX release from different CDL formulations after treatment with 6 h, 37 °C water incubation (A) or 1 min, 2 W·cm<sup>-2</sup>, 671 nm laser irradiation (B); C: Cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM) images of CDL; D: Particle size distribution of CDL measured by dynamic light scattering. SPC: Soybean phospholipid



**Figure 2** Photo-sensitive DOX release behaviors *in vitro* of CDL and its mechanism. A: Cumulative release of DOX from CDL or liposomes loaded with DOX (SDL) in PBS (pH 7.4) under 671 nm laser irradiation with different power; B: Cumulative release of DOX from CDL or SDL after 15 s, 0.25 W·cm<sup>-2</sup>, 671 nm laser irradiation in 37 °C, PBS (pH 7.4); C, D: Cryo-TEM images and particle size distribution of CDL after 4 min, 2 W·cm<sup>-2</sup>, 671 nm laser irradiation; E: Temperature change curves of CDL, SCL or SDL under 671 nm laser irradiation with different power; F: Cumulative release of DOX from CDL in 60 °C water bath; G: Cumulative release of DOX from CDL in 37 °C PBS (pH 7.4) after 15 s, 60 °C water incubation treatment; H: Generation of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> by CDL or SDL under 671 nm laser irradiation; I: Detection of oxidation products malondialdehyde (MDA) from liposomes loaded with Ce6tM (SCL) after 671 nm laser irradiation; J: Effects of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quencher NaN<sub>3</sub> on DOX release rate from CDL under 671 nm laser irradiation (2 W·cm<sup>-2</sup>). n=3,  $\bar{x} \pm s$

透射电镜观察了 CDL 经过 2 W·cm<sup>-2</sup>、671 nm 激光照射 4 min 后的形态, 见图 2C。CDL 在光照后仍然呈圆球形, 较为均一, 粒径在 90 nm 左右。未观察到脂质体膜明显破损。内水腔中 DOX 消失, 这与释放实验结果一致。粒度测定结果显示, 光照后 CDL 在 PBS (pH 7.4) 中粒径为 91.3±2.3 nm (图 2D), 多分散指数 (PDI) 为 0.123±0.020。Zeta 电位为 -1.5±0.2 mV, 仍然呈近中性。以上结果表明, 光照后 CDL 中 DOX 释放, 其形态与粒径大小并未发生明显变化。

升温曲线结果显示, CDL 在 2 W·cm<sup>-2</sup>、671 nm

光照过程中温度均略有升高 (图 2E), 0.25 W·cm<sup>-2</sup> 功率条件下, 温度几乎不变。在 60 °C 水浴孵育 4 min, CDL 中 DOX 几乎没有释放 (图 2F)。CDL 中 DOX 在 60 °C 水浴处理 15 s 后, CDL 中 DOX 的释放并没有加快, 与未经过任何处理的 CDL 组没有显著性差异 (图 2G)。以上结果表明, 温度不是导致 CDL 光敏感快速释放药物的主要因素。

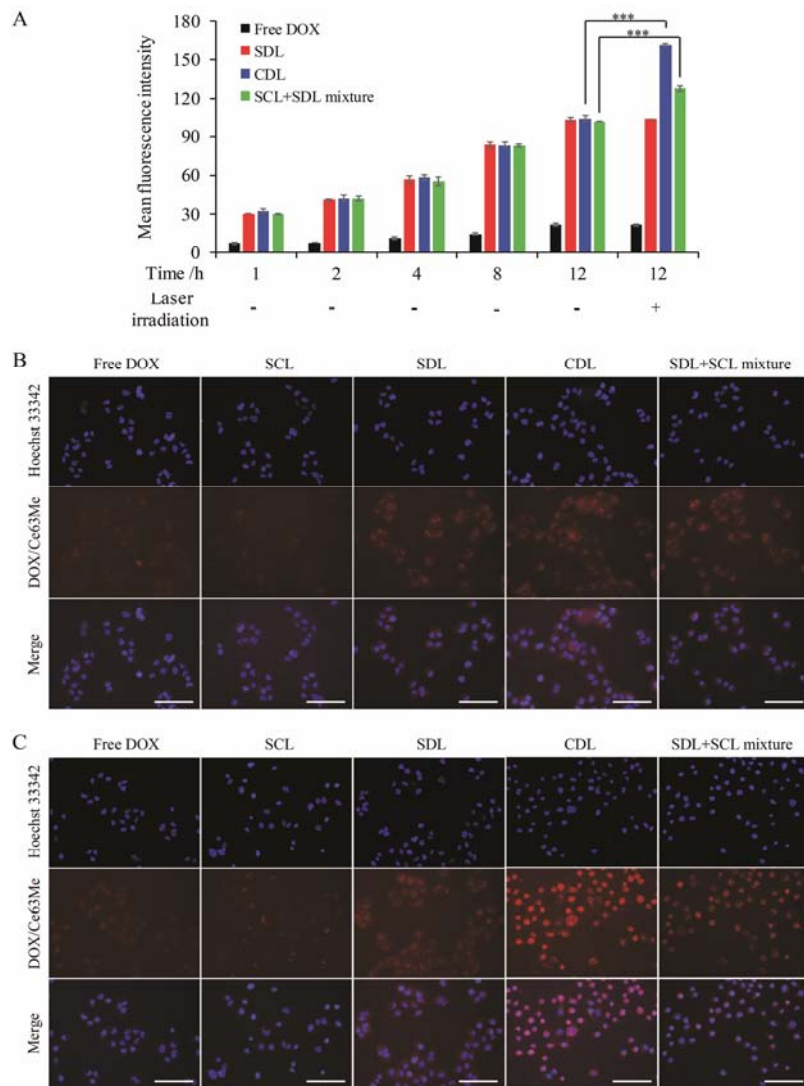
采用 SOSG 检测 CDL 在不同功率激光照射过程中 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 产生情况, 见图 2H。CDL 在 671 nm 的激光照射过程中, 溶液荧光强度增加, 表明有 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 产生, 并

且其产生速度与激光的功率呈正相关。当溶液中含  $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ } ^1\text{O}_2$  淬灭剂  $\text{NaN}_3$  时, 荧光信号明显减弱,  $^1\text{O}_2$  被淬灭。相同 DOX 浓度的 SDL 在激光照射过程中, 未见  $^1\text{O}_2$  产生。脂质类化合物在经过氧化后会逐渐分解成为一系列复杂的化合物, 其中包括 MDA。采用脂质氧化检测试剂盒检测了 SCL 在光照后大豆磷脂氧化产物的生成情况 (图 2I)。在  $671 \text{ nm}$  激光照射过程中, SCL 中有 MDA 产生, 并且与  $^1\text{O}_2$  的产生情况相似, 单位时间产生 MDA 的量与激光功率呈正相关。在相同条件下, SBL 组未见 MDA 产生。当 CDL 溶液中含  $\text{NaN}_3$  时, 光照条件下 DOX 的释药速度明显放缓 (图 2J)。结果表明,  $^1\text{O}_2$  的产生对 CDL 中 DOX

的光敏感释放起主导作用, 即光照条件下, CDL 中 Ce6tM 激发产生  $^1\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$  作用于磷脂双分子层, 增加其通透性, 加快药物的释放。

#### 4 DOX 细胞内蓄积

$671 \text{ nm}$  激光 ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $2 \text{ min}$ ) 照射前后, MCF7/ADR 细胞内 DOX 的蓄积情况见图 3。定量检测结果显示, MCF7/ADR 细胞的耐药性, 游离 DOX 在 MCF7/ADR 细胞中的蓄积量很低。与游离 DOX 比较, MCF7/ADR 细胞对脂质体制剂 SDL、CDL 和 SCL+SDL 混合物中 DOX 的摄取明显增加, 在  $12 \text{ h}$  时其荧光强度值分别是游离 DOX 的 4.70、4.76 和 4.65 倍 ( $P < 0.001$ )。经过  $671 \text{ nm}$  激光照射 ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,



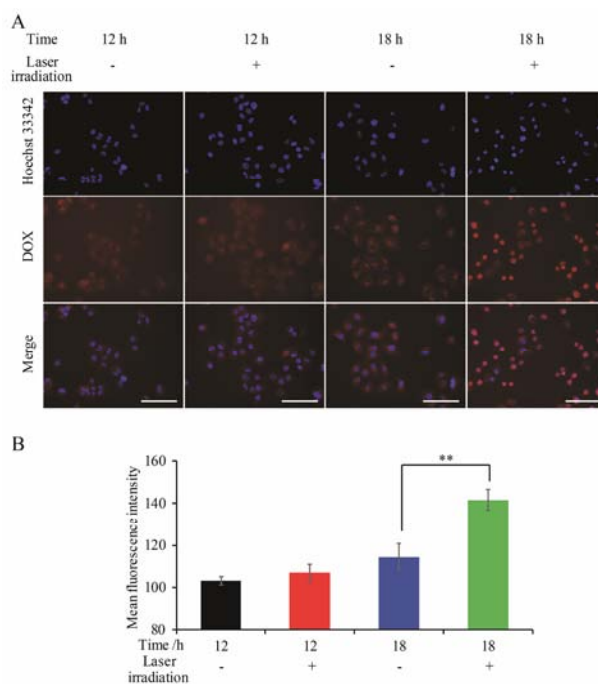
**Figure 3** DOX accumulation in MCF7/ADR cells after  $671 \text{ nm}$  laser irradiation ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $2 \text{ min}$ ). A: Quantitative analysis of DOX accumulation in MCF7/ADR cells after treatment with Free DOX, SDL, CDL, or SDL+SCL mixture for 1, 2, 4, 8, 12 h with or without  $671 \text{ nm}$  laser irradiation ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $2 \text{ min}$ ). Laser irradiation was executed at 12 h before detection; B, C: Fluorescence images of DOX or Ce6tM in MCF7/ADR cells after incubation with Free DOX, SCL, SDL, CDL, or SDL+SCL mixture for 12 h before or after  $671 \text{ nm}$  laser irradiation ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $2 \text{ min}$ ). Laser irradiation was executed at 12 h. Scale bars represented a distance of  $200 \mu\text{m}$ .  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\*  $P < 0.001$

2 min) 后, 不含光敏剂的游离 DOX 组和 SDL 组细胞内 DOX 的蓄积未发生明显变化。CDL 和 SDL+SCL 混合物组, 在光照后细胞内 DOX 的平均荧光强度值均有明显升高, 与光照前比较, 分别升高了 1.55 和 1.25 倍 ( $P < 0.001$ ), 并且 CDL 组明显强于 SDL+SCL 混合物组, 由荧光显微镜定性结果可知, 在第 12 h 时, 光照前所有的实验组中 DOX 主要分布在细胞质中。光照后, 游离 DOX 和 SDL 组细胞内 DOX 荧光强度未见明显变化, CDL 与 SDL+SCL 混合物组明显增强, 并且 CDL 组 DOX 荧光强度更强, 这之前定量检测的结果基本一致。并且在光照后, CDL 组 MCF7/ADR 细胞核内的 DOX 分布明显增多。

671 nm 激光 ( $0.25 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 15 s) 照射前后, CDL 组 MCF7/ADR 细胞内 DOX 的蓄积情况见图 4。结果显示, 在 12 h, CDL 在经过 671 nm 激光光照后, 细胞中 DOX 的平均荧光强度值未见明显升高, 可能与激光强度明显减弱有关。继续避光孵育 6 h 后, 与未光照组比较, 光照后 CDL 组细胞内 DOX 蓄积水平明显提高 (1.24 倍,  $P < 0.001$ )。荧光显微镜图片与流式细胞仪定量结果一致, 并且可以观察到, CDL 光照组在 18 h 时 DOX 细胞核内蓄积明显增加。这可能与 CDL 低功率、短时间光照的光敏感释药行为有关。

## 5 细胞毒性

采用 CCK8 法检测 671 nm 激光 ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 2 min) 照射后 CDL 对 MCF7 和 MCF7/ADR 细胞的细胞毒性, 见图 5A。IC<sub>50</sub> 值见表 1。因为与敏感的 MCF7 细胞比较, MCF7/ADR 细胞中一些耐药相关蛋白过表达 (如 P 糖蛋白等), 游离 DOX 对细胞的毒性很小。DOX 的脂质体制剂 SDL、CDL 和 SDL+SCL 混合物组对 MCF7/ADR 细胞的细胞毒性比游离 DOX 略有增加, 这可能与脂质体制剂有利于增加 DOX 在耐药细胞中的蓄积有关。SCL 未光照组在 Ce6tM 质量浓度为  $0 \sim 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内对 MCF7/ADR 和 MCF7 细胞均无明显毒性, 光照后 SCL 的细胞毒性明显增强。对于 MCF7 和 MCF7/ADR 细胞, 当 Ce6tM 浓度为  $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 未光照 SCL 组细胞存活率分别为  $(95.8 \pm 1.0)\%$  和  $(95.3 \pm 1.7)\%$ , 而光照 SCL 组细胞的存活率仅为  $(5.2 \pm 0.6)\%$  和  $(20.7 \pm 4.6)\%$ 。这与 Ce6tM 在 671 nm 激光照射过程中产生  $^1\text{O}_2$  有关。不含光敏剂 Ce6tM 的实验组 (游离 DOX 和 SDL 组) 的细胞毒性在光照前后未见明显变化, 表明 671 nm 光照对 DOX 的细胞毒性没有显著影响。含光敏剂 Ce6tM 的实验组 (CDL 和 SDL+SCL 混合物组) 在激光照射后细胞毒性均显著增强, 并且这种效果在耐药的 MCF7/



**Figure 4** DOX accumulation in MCF7/ADR cells after 671 nm laser irradiation ( $0.25 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 15 s). A: Fluorescence images of DOX in MCF7/ADR cells after incubation with CDL for 12 h or 18 h with or without 671 nm laser irradiation ( $0.25 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 15 s). Laser irradiation was executed at 12 h. Scale bars represented a distance of 200  $\mu\text{m}$ . B: Quantitative analysis of DOX accumulation in MCF7/ADR cells after incubation with CDL for 12 h or 18 h with or without 671 nm laser irradiation ( $0.25 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 15 s). Laser irradiation was executed at 12 h.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$

ADR 细胞上更加明显。光照后 CDL 和 SDL+SCL 混合物组对 MCF7/ADR 细胞的 IC<sub>50</sub> 值比光照前分别降低了 601.90 和 27.95 倍, 表明光照组 CDL 能够有效增强 MCF7/ADR 细胞对 DOX 的敏感性。

进一步考察了短时间、低功率 ( $0.25 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 15 s) 光照对不同制剂中 DOX 在 MCF7/ADR 细胞中的细胞毒性, 见图 5B。由于激光功率低、光照时间短, 光照后 SCL 组没有表现出明显的细胞毒性。未光照 CDL 组和光照 SDL 组细胞毒性也不明显。CDL 光照组细胞毒性明显增加。这可能与低功率、短时间光照条件下 CDL 中 DOX 的释药特性有关。

## 6 细胞内 $^1\text{O}_2$ 的产生

利用 2,7-二氯荧光素二乙酸酯作为探针检测 CDL 在细胞中产生  $^1\text{O}_2$  的情况, 见图 5C。不含光敏剂 Ce6tM 的实验组 (空白对照组、游离 DOX 和 SDL 组) 细胞内荧光强度值在光照前后无明显变化。SCL、CDL 和 SDL+SCL 混合物组细胞内的荧光强度值在光照后明显增加, 分别为光照前的 10.45、9.91 和 9.96 倍 ( $P < 0.001$ ), 表明在光照后 SCL、CDL 和 SDL+SCL

**Table 1** IC<sub>50</sub> values and 95% confidence intervals (CIs) of DOX in MCF7 and MCF7/ADR cells after treatment with free DOX, SDL, CDL or SDL+SCL mixture for 48 h with or without laser irradiation. 671 nm laser irradiation (2 min, 2 W·cm<sup>-2</sup>) was executed at 12 h

	Laser irradiation	MCF7/ADR cell		MCF7 cell	
		IC <sub>50</sub> /μg·mL <sup>-1</sup>	95% CI	IC <sub>50</sub> /μg·mL <sup>-1</sup>	95% CI
Free DOX	-	214.6	145.10 - 442.60	0.34	0.26 - 0.45
	+	229.0	153.00 - 485.30	0.36	0.29 - 0.44
SDL	-	166.2	126.30 - 244.50	0.35	0.27 - 0.45
	+	136.5	112.60 - 175.80	0.35	0.27 - 0.46
CDL	-	126.4	99.83 - 178.10	0.25	0.20 - 0.33
	+	0.2	0.13 - 0.33	0.12	0.09 - 0.18
SDL+SCL mixture	-	137.5	106.10 - 202.30	0.27	0.19 - 0.37
	+	4.9	3.76 - 6.37	0.12	0.08 - 0.18

混合物组 MCF7/ADR 细胞内 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 水平迅速显著升高。

## 7 细胞内 ATP 水平

MCF7/ADR 细胞具有较强的药物外排能力, 其中一部分原因是它的细胞膜表面 P 糖蛋白过表达。P 糖蛋白是 ABC 蛋白家族中的一员, 它发挥作用时需要 ATP 提供能量。降低 MCF7/ADR 细胞内 ATP 的水平对逆转耐药有重要意义。光照前后 CDL 对 MCF7/ADR 细胞内 ATP 水平的影响, 见图 5D。MCF7/ADR 细胞在游离 DOX、SDL、SCL、CDL 和 SDL+SCL 混合物孵育 24 h 后, 细胞内 ATP 水平均未发生明显变化。光照后, 空白对照组和 SDL 组细胞内的 ATP 水平也没有发生变化。SCL、CDL 和 SDL+SCL 混合物组细胞内 ATP 水平在光照后明显降低, 分别为光照前的 0.37、0.32 和 0.36 倍 ( $P < 0.001$ )。这可能与光敏剂在光照过程中产生的 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 的破坏作用以及细胞活力的降低有关。

## 8 细胞周期

经过不同制剂处理后, 各组 MCF7/ADR 细胞的周期分布情况见图 5E。未光照的游离 DOX 组和 SCL 组细胞的周期分布和空白对照组接近。未光照的 DOX 脂质体制剂组 (SDL、CDL 和 SDL+SCL 混合物组) 的细胞比空白对照组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的分布略有减少, G<sub>2</sub>/M 期略有增加。游离 DOX 和 SDL 组的细胞在经过光照处理后细胞周期与光照前未发生明显改变。SCL、CDL 和 SDL+SCL 混合物光照组细胞周期发生显著变化, 主要表现为 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的分布明显降低, G<sub>2</sub>/M 期分布明显增加。其中 CDL 光照组细胞的细胞周期分布变化最大, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期、S 期和 G<sub>2</sub>/M 期分别从空白对照组的 56.39%、33.69% 和 9.92% 变化为 17.33%、44.64% 和 38.03%, 细胞周期被明显阻滞。

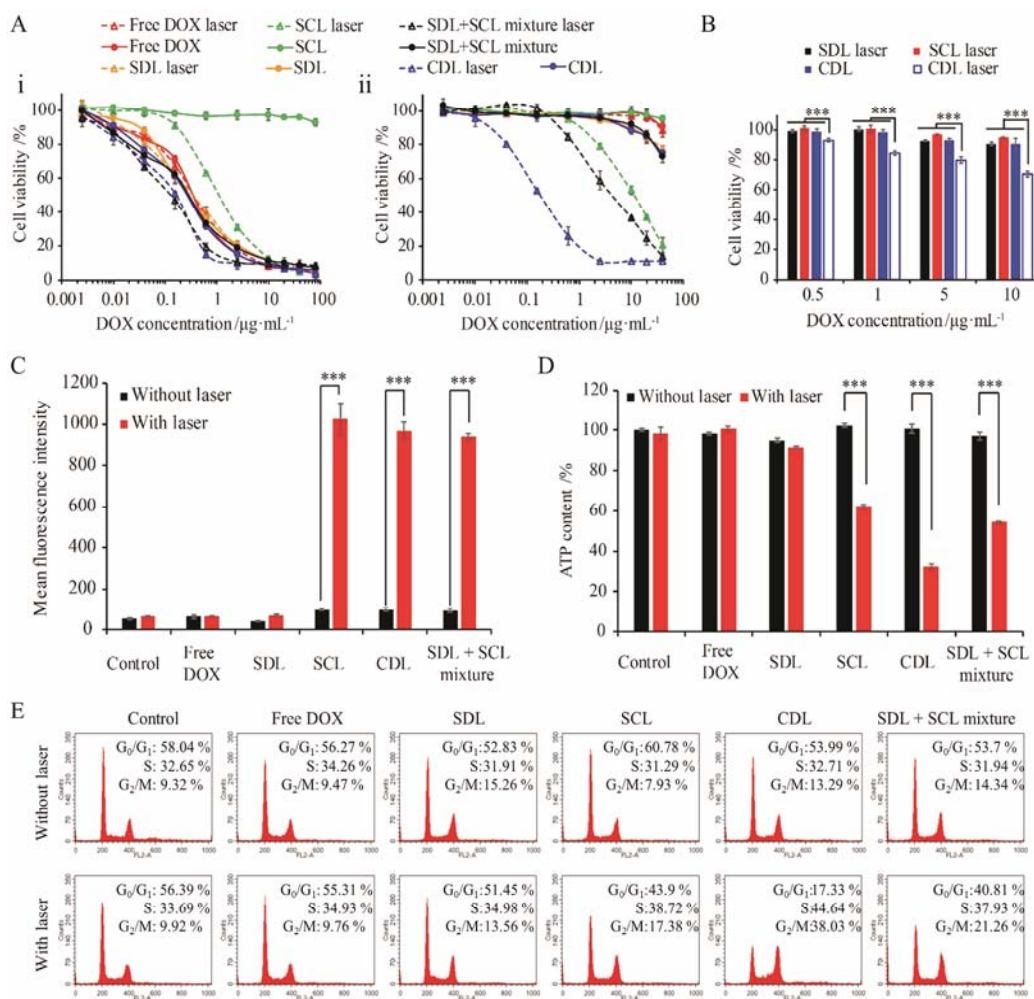
## 9 DOX 体内分布

DOX 在荷 MCF7/ADR 肿瘤裸鼠体内各组织的分布情况见图 6。考虑到细胞水平与动物水平的不同,

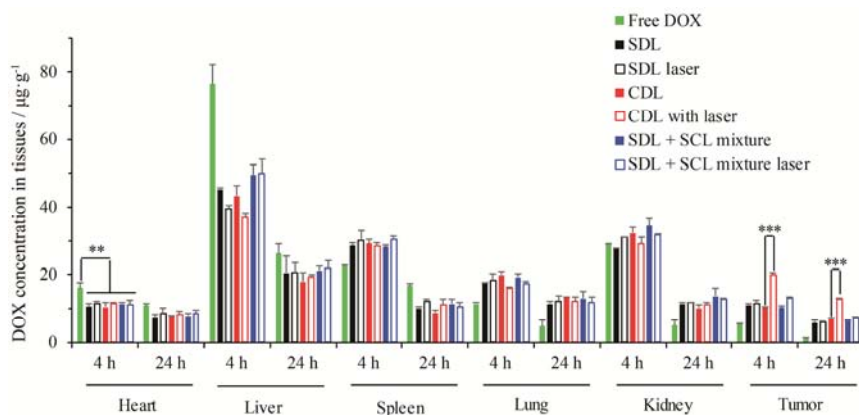
动物给药后光照治疗时间的选择在此主要依据预实验中 DOX 肿瘤组织内分布峰值时间而确定 (4 h, 结果未列出)。结果显示, 给药 4 h 后, 未光照的 SDL、CDL 和 SDL+SCL 混合物组中 DOX 在各组织脏器中的分布基本一致, 并且所有脂质体制剂组在心脏组织中 DOX 分布明显少于游离 DOX 组, 这与脂质体的包载有关。脂质体表面有 PEG 层覆盖, 呈近中性, 该 PEG 层能够减缓药物在体内的清除速率, 延长脂质体的血液循环时间, 并且脂质体的粒径在 90 nm 左右, 能够利用 EPR 被动靶向效应, 增加 DOX 在肿瘤组织中的蓄积。SDL 组光照后在肿瘤部位的分布未见明显变化, 这可能与 671 nm 光照 (2 W·cm<sup>-2</sup>, 2 min) 对 SDL 中 DOX 释放行为及在 MCF7/ADR 细胞中的蓄积均没有显著影响有关。CDL 组明显增多, 增加了 1.93 倍。给药 24 h 后, 脂质体制剂组在肿瘤部位的蓄积明显多于游离 DOX 组。光照 CDL 组的 DOX 在肿瘤部位依然保持着较高的蓄积。

## 10 药效学评价

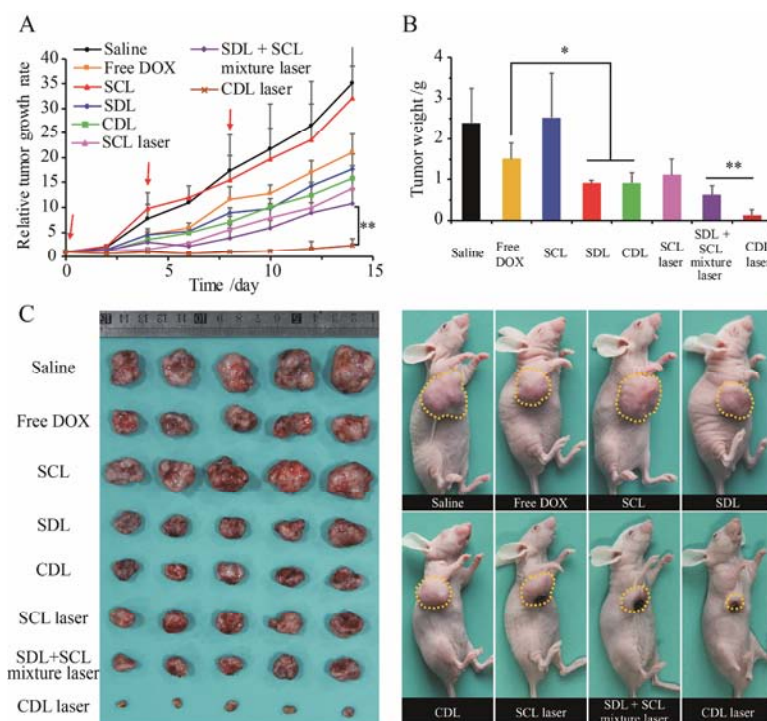
经过不同制剂给药后, 各组荷 MCF7/ADR 乳腺癌裸鼠肿瘤体积变化情况见图 7。结果显示, 生理盐水组荷瘤裸鼠的肿瘤体积增加非常迅速, 在 14 天内, 肿瘤平均体积比第 1 次给药时增加了 34.11 倍。由于 SCL 在未光照时细胞毒性较低, SCL 组的肿瘤体积变化曲线与生理盐水组相似, 14 天后增加了 31.09 倍。DOX 的脂质体制剂 SDL 和 CDL 组抑制肿瘤的效果优于游离 DOX 组。CDL 组和 SDL 组抑瘤效果近似, 这也再次说明了 Ce6tM 分子在未光照条件下几乎没有抗肿瘤活性。SCL 光照组光照后, TIR 达到 (53.2±15.9)%, 说明光照过程中 SCL 产生的 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 能够有效地杀死肿瘤细胞。游离 DOX 组、SDL 组、CDL 组、SCL 光照组、SDL+SCL 混合物光照组和 CDL 组均显示了不同程度的抑制肿瘤生长的效果, 它们对应的 TIR 分别为 (36.8±16.4)%, (61.8±3.0)%, (61.4±10.2)%、



**Figure 5** A: Cell viabilities of MCF7 (i) and MCF7/ADR (ii) cells after treatment with free DOX, SDL,SCL, CDL or SDL+SCL mixture for 48 h at different concentrations. In addition to the special note, the experimental condition of laser group was 2 min, 2  $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 671 nm and the laser irradiation was executed at 12 h. The mass ratio of DOX to Ce6tM was 5:1; B: Cell viabilities of MCF7/ADR cells after treatment with SDL, SCL and CDL for 48 h at different concentrations with or without laser irradiation (671 nm, 0.25  $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 15 s); C: Determination of  $^1\text{O}_2$  in MCF7/ADR cells after incubation with free DOX, SDL, SCL, CDL or SDL+SCL mixture for 12 h with or without laser irradiation; D: ATP levels in MCF7/ADR cells after incubation with free DOX, SDL, SCL, CDL, and SDL+SCL mixture for 24 h; E: Flow cytometry analysis for cell cycle changes of MCF7/ADR cells induced by free DOX, SCL, SDL, CDL or SDL+SCL mixture for 24 h.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \*\*\* $P<0.001$



**Figure 6** Quantitative analysis of *in vivo* biodistribution of DOX in MCF7/ADR tumor-bearing mice at 4 h and 24 h after intravenous administration of free DOX, SDL, CDL and SDL+SCL mixture. 671 nm laser irradiation (2  $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 2 min) was executed at 4 h after administration. The dose of doxorubicin was 5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$



**Figure 7** Inhibitory effect of CDL on tumor growth. A: The variation profiles of tumor volumes. The red arrows indicated the time points for drug administrations; B: Tumor weights at the end of the experiment; C: Picture of tumors on day 14 after first drug administration and representative photos of tumor-bearing mice at the end of the experiment.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

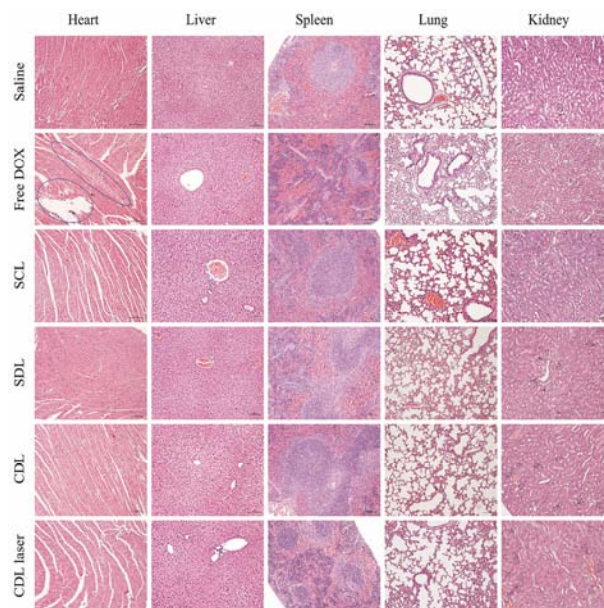
( $53.2 \pm 15.9$ )%、( $76.1 \pm 11.6$ )% 和 ( $94.7 \pm 6.2$ )%。CDL 光照组抑瘤效果最为显著, 14 天后肿瘤体积仅增加了 1.22 倍。这可能与 DOX 化疗、Ce6tM 光动力学治疗及 DOX 光敏感快速释放特性 3 种因素在增强抗肿瘤活性上有一定的协同效应有关。

### 11 初步的生物安全性评价

给药后, BALB/c-nu 裸鼠各脏器的 HE 染色切片结果见图 8。据文献报道, DOX 在高剂量多次给药后, 会引起严重的系统毒性, 包括心脏毒性和肾毒性等<sup>[16]</sup>。在实验中观察到类似的现象, 在给药 14 天后, 游离 DOX 组的心脏组织 HE 切片明显异常。CDL 和 CDL 光照组没有引起裸鼠的心、肝、脾、肺和肾组织的炎症反应或病理损伤, 表明光敏剂 Ce6tM 具有较高的生物安全性, 并且光照是一种局部治疗手段, 对于未光照的组织器官, Ce6tM 没有明显细胞毒性, 此外, CDL 有助于减少 DOX 在心脏组织中的分布, 减轻 DOX 的毒副作用。

### 结论

本文首先采用薄膜水化-硫酸铵主动载药法制备了具有光敏感特性的 Ce6tM 与 DOX 的共输送脂质体 CDL。以 37 °C 条件下脂质体中 DOX 包载稳定性及光敏感释药速度为指标, 确定了最佳处方, 即 Ce6tM



**Figure 8** Histopathological analysis of tissue sections stained with HE after treatments with saline, free DOX, SCL, SDL, CDL and CDL laser. The blue circle indicated the injured myocardium tissue area. The scale bars represented a distance of 100  $\mu\text{m}$

载药量 3%, 胆固醇与 SPC 质量比为 1 : 4。CDL 具有良好的光刺激响应性, 可以在 671 nm 激光照射过程中快速释放内水腔中包载的化疗药物 DOX。同时, CDL 在短时间、低功率的激光照射后, 与未光照组相

比, DOX 释放速度明显加快。对 CDL 光敏感释药现象的机制进一步探索发现, Ce6tM 在光照下光动力学反应对脂质体中 DOX 的释放起主导作用。光动力学过程中产生的  $^1\text{O}_2$  作用于脂质体膜, 不可逆地破坏了其化学结构, 增加了脂质体磷脂双分子层的通透性。从体外耐 DOX 的 MCF7/ADR 乳腺癌细胞模型实验结果可以看出, CDL 同时具有的光动力学治疗、化疗和光敏感释药功能在一定程度上能够更好地逆转乳腺癌的耐药。初步的机制研究结果表明, 这可能与肿瘤细胞内 DOX 的蓄积增加、ATP 水平降低及细胞周期的阻滞有关。荷 MCF7/ADR 乳腺癌细胞 BALB/c-nu 裸鼠动物模型的动物实验结果表明, CDL 光照组肿瘤组织中 DOX 的蓄积显著增加, 并且显示出良好抗肿瘤生长的效果, TIR 达到  $(94.7 \pm 6.2)\%$ 。此外, CDL 制备过程简单, 对纳米药物产业化具有一定的指导意义。

## References

- [1] Chen WQ. Cancer statistics: updated cancer burden in China [J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27: 1.
- [2] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 115–132.
- [3] Yin Q, Shen JN, Zhang ZW, et al. Reversal of multidrug resistance by stimuli-responsive drug delivery systems for therapy of tumor [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65: 1699–1715.
- [4] He QY. Tumor heterogeneity and drug resistance of targeted antitumor agents [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 197–201.
- [5] Swain SM, Baselga J, Kim SB, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372: 724–734.
- [6] Lucena SR, Salazar N, Gracia-Cazaña T, et al. Combined treatments with photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 25912–25933.
- [7] Tang S, Yin Q, Zhang ZW, et al. Co-delivery of doxorubicin and RNA using pH-sensitive poly ( $\beta$ -amino ester) nanoparticles for reversal of multidrug resistance of breast cancer [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 6047–6059.
- [8] Wang TT, Wang DG, Yu HJ, et al. Intracellularly acid-switchable multifunctional micelles for combinational photo/chemotherapy of the drug-resistant tumor [J]. *ACS Nano*, 2016, 10: 3496–3508.
- [9] Park SJ, Park W, Na K. Tumor intracellular-environment responsive materials shielded nano-complexes for highly efficient light-triggered gene delivery without cargo gene damage [J]. *Adv Funct Mater*, 2015, 25: 3472–3482.
- [10] Hu YP, Zhou HY, Shen S. Preparation of doxorubicin-loaded  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\text{TiO}_2$  nanoparticles and evaluation of chemo-photodynamic therapy *in vivo* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1340–1344.
- [11] Gao GY, Chen ML, Li MY, et al. Current status and prospect of translational medicine in nanotechnology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 919–924.
- [12] Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy [J]. *Chem Rev*, 2015, 115: 1990–2042.
- [13] Manzoor AA, Lindner LH, Landon CD, et al. Overcoming limitations in nanoparticle drug delivery: triggered, intravascular release to improve drug penetration into tumors [J]. *Cancer Res*, 2012, 72: 5566–5575.
- [14] Kong G, Anyarambhatla G, Petros WP, et al. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 6950–6957.
- [15] Frangioni JV. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7: 626–634.
- [16] Saad SY, Najjar TA, Al-Rikabi AC. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats [J]. *Pharmacol Res*, 2001, 43: 211–218.