

## 光敏活性氧自由基响应脂质体的制备和评价

卢光照, 侯 成, 张 翮, 孙治国, 鲁 莹, 钟延强, 邹 豪\*

(第二军医大学药学院, 上海 200433)

**摘要:** 本文制备光敏感型活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 响应脂质体, 研究其体外抗肿瘤活性。采用硫酸铵梯度法制备共输送光敏剂八丁氧基酞菁钯 [1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxypalladium phthalocyanine, PdPC(OBu)<sub>8</sub>] 与盐酸多柔比星 (doxorubicin hydrochloride, DOX) 的脂质体 [liposome loaded with PdPC(OBu)<sub>8</sub> and DOX, LPD], 考察 LPD 的粒径、zeta 电位、透射电镜照片、光敏感型 ROS 响应药物的光响应释放及在血清中稳定性, 进一步考察 LPD 在 MCF-7 细胞中的细胞毒性、细胞摄取及细胞内单线态氧 (singlet oxygen, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 水平。结果显示, LPD 的粒径为 (169.3±1.2) nm, PDI 为 0.198±0.003, 粒径均匀, zeta 电位为 (-39.8±0.8) mV。LPD 具有良好的光响应释放特性, 在 730 nm 激光以 300 mW·cm<sup>-2</sup> 光照强度下, 5 min 内 DOX 释放率达到 95.5%。LPD 能显著促进 DOX 的细胞摄取, 而且光照时细胞内能产生大量 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>。与游离 DOX 相比, LPD 未光照时 IC<sub>50</sub> 下降 67.9%, 光照时 IC<sub>50</sub> 下降 85.7%。因此, 光敏 ROS 响应脂质体是具有前景的给药系统。

**关键词:** 光敏; 活性氧自由基; 脂质体; 光敏剂; 单线态氧

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 12-1942-09

## Preparation and evaluation of photo-sensitive reactive oxygen species responsive liposomes

LU Guang-zhao, HOU Cheng, ZHANG He, SUN Zhi-guo, LU Ying,  
ZHONG Yan-qiang, ZOU Hao\*

(School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** Photo-sensitive reactive oxygen species (ROS) responsive liposomes loaded with 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxypalladium phthalocyanine [PdPC(OBu)<sub>8</sub>] and doxorubicin hydrochloride (DOX) (LPD) were prepared by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-gradient method. LPD was characterized with transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering particle size, zeta potentials, photo-sensitive ROS-responsive DOX release behaviors and the serum stability *in vitro*. LPD cytotoxicity, DOX uptake and singlet oxygen production in MCF-7 cells were evaluated. The results showed that the particle size of LPD was (169.3±1.2) nm, PDI of LPD was 0.198±0.003 and zeta potentials of LPD was (-39.8±0.8) mV. The accumulated release of DOX reached 95.5% in 5 min under 730 nm laser irradiation (300 mW·cm<sup>-2</sup>). The DOX uptake of liposome was increased and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> was generated. The half inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) of DOX in LPD with irradiation group was decreased by 85.7% and no irradiation group was decreased by 67.9% compared with free DOX group in MCF-7 cells. Therefore, photo-sensitive ROS-responsive liposomes would be a promising drug delivery system for tumor therapy.

**Key words:** photo-sensitive; reactive oxygen species; liposome; photosensitizer; singlet oxygen

收稿日期: 2017-09-04; 修回日期: 2017-09-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30801441, 81773278); 军队后勤科研重大项目 (AWS14J011).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-81871287, E-mail: haozou@smmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0864

智能、可控和高效的刺激响应性药物传递载体是当今药物传递系统的研究及临床试验的热点。刺激响应性载体不仅可以提高药物在肿瘤部位的蓄积,而且可以精确控制药物的释放。刺激响应性载体包括 pH 响应性载体<sup>[1]</sup>、还原响应性载体<sup>[2]</sup>、光响应性载体<sup>[3]</sup>、超声响应性载体、磁场响应性载体、热响应性载体<sup>[4]</sup>及活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 响应性载体<sup>[5]</sup>等。其中, ROS 响应性载体具有响应速度快、灵敏度高的优势,主要是针对细胞内过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sup>[6]</sup>、单线态氧 ( $^1\text{O}_2$ )<sup>[7]</sup>、羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ )<sup>[8]</sup>和超氧化物<sup>[6]</sup>等响应。本课题组前期综述<sup>[9]</sup>总结的 ROS 响应性载体主要包括含硫多聚物 ROS 响应载体<sup>[10]</sup>、含硒多聚物 ROS 响应载体<sup>[11]</sup>、含碲多聚物 ROS 响应载体<sup>[12]</sup>和含不饱和磷脂 ROS 响应载体。

在众多的 ROS 响应性载体,含不饱和磷脂 ROS 响应载体最具发展潜力,不饱和磷脂能被  $^1\text{O}_2$  快速氧化,从而实现载体中药物的快速释放。不饱和磷脂主要有蛋黄卵磷脂<sup>[13]</sup>、二油酰磷脂酰胆碱 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC)<sup>[14]</sup>及二亚油酰磷脂酰胆碱 (1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC)。

鉴于含不饱和磷脂 ROS 响应载体需要  $^1\text{O}_2$  才能实现 ROS 响应,而光敏剂在光照后可以产生  $^1\text{O}_2$ 。因此,本课题将含不饱和磷脂 ROS 响应载体与光敏剂联合使用,构建光敏活性氧自由基响应脂质体。光敏剂分为第一代光敏剂和第二代光敏剂,第二代光敏剂较第一代光敏剂具有光毒副作用小、组织渗透能力强、 $^1\text{O}_2$  产率高的优点,因此第二代光敏剂被称为具有前景的光敏剂<sup>[15]</sup>。第二代光敏剂主要包括卟啉类光敏剂和酞菁 (phthalocyanine, PC) 类光敏剂,其中酞菁类光敏剂的吸收波长 (660~900 nm) 正好在人体组织最佳透射波段范围内,其对人体组织的相容性较好、对皮肤光毒性远小于卟啉类光敏剂,光与热稳定性也好于卟啉类光敏剂,是第二代光敏剂的典型代表<sup>[16]</sup>。1,4,8,11,15,18,22,25- 八丁氧基酞菁钯 [ $\text{PdPC}(\text{OBU})_8$ ] 的最大吸收波长在 730 nm 附近,具有良好的组织相容性, $^1\text{O}_2$  产率高,是有前景的光敏剂。

本研究以  $\text{PdPC}(\text{OBU})_8$  为光敏剂,盐酸多柔比星 (DOX) 为化疗药物,DLPC 为不饱和磷脂,构建和评价光敏 ROS 响应脂质体 [liposome loaded with  $\text{PdPC}(\text{OBU})_8$  and DOX, LPD], 考察 LPD 在近红外光照射下的 ROS 响应释放情况,以期增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,精确控制药物的释放,结合光动力学产生大量  $^1\text{O}_2$  可以从不同的机制出发杀死肿瘤细

胞,从而改善光敏 ROS 响应脂质体的治疗效果。

## 材料与方法

**仪器** R206D 旋转蒸发仪 (上海申生科技有限公司); 678 nm 光纤激光器 (恩耐激光技术有限公司定制); GG-730-1500MW 激光器 (长春市亮丽光电有限公司); Agilent 1100 系列高效液相色谱-质谱仪 (美国安捷伦公司); JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 马尔文激光粒度仪 (英国 Malvern 公司); JEM2100F 透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司); TCS SP5 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); FACScan 流式细胞仪 (美国 Beckon Dickson 公司); UV1102 紫外-可见分光光度计 (Techcomp 公司); Multiscan MK-3 酶标仪 (Thermo 公司); F-7000 荧光分光光度计 (日本 Hitachi 公司); 荧光显微镜 (Olympus 公司)。

**试剂** DOPC、DLPC (Avanti 公司); 二硬脂酰磷脂酰胆碱 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC, Corden Pharma 公司); 氢化大豆卵磷脂 (HSPC)、DSPE-mPEG<sub>2000</sub> (Lipoid 公司); 胆固醇 (cholesterol)、 $\text{H}_2\text{PC}(\text{OBU})_8$ 、氯化钯 ( $\text{PdCl}_2$ ) (Sigma-Aldrich 公司); 1,3-二苯基异苯并呋喃 (DPBF, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、甲苯、曲拉通 X-100、氯仿、乙醇、甲醇、硫酸铵  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  (国药集团化学试剂有限公司); PBS (上海双螺旋生物科技有限公司); DOX、LysoTracker Green DND-26、Hoechst 33342 (大连美仑生物技术有限公司); 超氧化物阴离子荧光探针 (DHE, 碧云天生物技术有限公司)。

**光敏剂的合成与鉴别** 按  $\text{H}_2\text{PC}(\text{OBU})_8$  与  $\text{PdCl}_2$  以 1 : 3 摩尔比称取,置于圆底烧瓶中,加入无水 DMF 3 mL 溶解,氮气缓慢吹打 30 min 除去空气。将烧瓶置于 120 °C 油浴搅拌 24 h,用油泵在 65 °C 水浴中旋转蒸发干燥。最后加入甲苯 (toluene) 溶解固体,过 0.22  $\mu\text{m}$  有机膜,65 °C 旋干,真空干燥,称重,计算产率。

观察固体颜色,然后分别用甲苯、DMF 和乙醇 (ethanol) 溶解少量固体,用  $\text{H}_2\text{PC}(\text{OBU})_8$  作为对照,进行紫外扫描。用甲醇溶解  $\text{PdPC}(\text{OBU})_8$  和  $\text{H}_2\text{PC}(\text{OBU})_8$ ,质谱扫描  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

**光敏 ROS 响应脂质体的制备** 采用硫酸铵梯度法制备脂质体。精密称取 DLPC (DOPC 或 HSPC)、DSPC、cholesterol 及 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 两份溶于氯仿

中, 其中一份加入 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 氯仿溶液, 用于制备 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 脂质体 [liposome loaded with PdPC(OBu)<sub>8</sub>, LP], 另一份不加药物用于制备空白脂质体 (blank liposome, BP)。37 °C 减压旋转蒸发形成均匀薄膜。精密吸取 125 mmol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (PBS, pH 7.4) 溶液 2 mL 水化。将脂质体取出, 200 W 探头超声 2 min, 400 W 探头超声 6 min。将 LP 置于 5% 蔗糖溶液透析, 每次 1.5 h, 透析 3 次, 加入 DOX 粉末 4 mg, 65 °C 孵育 30 min, 取出, 室温冷却, 得到 LPD。

**光敏 ROS 响应脂质体的处方筛选** 以药物包封率、脂质体药物释放和脂质体在血清中的稳定性为指标, 从磷脂、激光器波长、DLPC 用量、cholesterol 用量及 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 投药量对 ROS 响应脂质体进行优化。

#### 光敏 ROS 响应脂质体的表征

**粒径与 zeta 电位** 将脂质体溶液稀释至适当浓度, 使用马尔文激光粒度仪测定纳米脂质体的粒径、zeta 电位。

**包封率与载药量** 采用紫外分光光度法测定纳米脂质体 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 的包封率 (encapsulation efficiency, EE) 和载药量 (drug loading, DL), 荧光分光光度法测定纳米脂质体 DOX 的包封率和载药量, 按以下公式计算: EE=脂质体中药物/投药量×100%; DL=脂质体中药物/载药×脂质体总质量×100%。

**脂质体的形态** 用透射电子显微镜观察光照及未光照处理的脂质体溶液, 考察脂质体的形态变化。

**光敏 ROS 响应脂质体药物的体外释放<sup>[14]</sup>** 采用 730 nm 激光以 300 mW·cm<sup>-2</sup> 光照强度照射具塞玻璃管中不断搅拌的脂质体溶液, 用荧光分光光度计测量 DOX 的释放情况。荧光测定条件: E<sub>x</sub>=480 nm, E<sub>m</sub>=560 nm; 扫描速度为 240 nm·min<sup>-1</sup>; 电压为 400 V; 狭缝宽度为 10 nm; 响应值为 0.1 s。首先检测脂质体溶液的初始荧光值 F<sub>initial</sub>, 每隔一段时间测量该时间点的荧光值 F, 最后加入 0.25% 曲拉通 X-100 超声破乳脂质体后读取荧光值 F<sub>X-100</sub>。利用公式 (1) 计算 DOX 释放率。

$$\text{DOX} = \frac{F - F_{\text{initial}}}{F_{\text{X-100}} - F_{\text{initial}}} \times 100\% \quad (1)$$

**光敏 ROS 响应脂质体在血清中的稳定性<sup>[14]</sup>** 采用 37 °C 水浴孵育 10% 血清稀释的脂质体溶液, 用荧光分光光度计测量 DOX 的泄露情况。利用公式 (1) 计算 DOX 泄漏率。

**脂质体溶液中 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 的检测** DPBF 是一种疏水性的 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 检测探针, 403 nm 波长激发下, DPBF 在 480 nm 处有最大荧光发射强度。当 DPBF 被 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 氧化后, 其

发射强度会发生下移。在一定范围内, 其峰值的下降水平与 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 的产生量呈现一定的相关性 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 产量越高, 峰值下降越低)。将光敏剂脂质体稀释成一定浓度, 然后加入 100 μL DPBF 乙醇溶液 (0.3 mg·mL<sup>-1</sup>)。以 403 nm 波长激发, 扫描 425~630 nm 的荧光发射强度。然后 730 nm 激光以 300 mW·cm<sup>-2</sup> 照射 3 min, 再次扫描 425~630 nm 的荧光发射强度。

#### 光敏 ROS 响应脂质体的细胞摄取

**共聚焦激光显微镜定性观察细胞摄取** 配制细胞数为每毫升 1×10<sup>5</sup> 个的 MCF-7 细胞悬液, 取 1 mL 细胞悬液于激光共聚焦皿 (圆柱形, 35 mm), 置于细胞培养箱孵育 12 h 使其贴壁。弃掉培养基, 换为含药 [PdPC(OBu)<sub>8</sub>: 0.5 μg·mL<sup>-1</sup>; DOX: 5 μg·mL<sup>-1</sup>] 的培养基。4 h 后, 光照组进行光照 (730 nm、1 200 mW·cm<sup>-2</sup>, 3 min), 去除培养基, PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 10 min, PBS 洗涤 3 次, 1 μg·mL<sup>-1</sup> DAPI 1 mL 避光染色 10 min, PBS 洗涤 3 次, 加入 PBS 1 mL 置于共聚焦激光显微镜进行观察。

**流式细胞仪定量观察细胞摄取** 配制细胞数为每毫升 5×10<sup>5</sup> 个的 MCF-7 细胞悬液, 取细胞悬液 1 mL 于 6 孔板中, 置于细胞培养箱孵育 12 h 使其贴壁。替换培养基为含 2 μg·mL<sup>-1</sup> DOX 的培养基 1 mL, 孵育 1 h 后, 光照组进行光照处理 (730 nm、1 200 mW·cm<sup>-2</sup>, 3 min), 去除培养基, 用 PBS (pH 7.4) 冲洗 3 次, 胰酶消化, 再用 PBS 冲洗 3 次, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 最后吸取 0.5 mL PBS 重悬, 避光保存, 通过流式细胞仪检测。

**ROS 响应脂质体在细胞内的分布** 取对数生长期 MCF-7 细胞, 以每毫升 1×10<sup>5</sup> 个细胞数取 1 mL 铺板于玻璃皿中, 12 h 细胞贴壁后, 去掉培养基。给药 (5 μg·mL<sup>-1</sup> DOX), 37 °C 细胞培养箱孵育 4 h, 去掉培养基, PBS 洗 3 次, 加入 LysoTracker Green DND-26 (100 nmol·L<sup>-1</sup>) 1 mL 染色 10 min, 去掉染液, PBS 洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 10 min, PBS 洗 3 次, 加入 Hoechst 33342 (10 μg·mL<sup>-1</sup>) 1 mL 染色 15 min。PBS 洗 3 次, 加入 PBS 1 mL 置于共聚焦激光显微镜进行观察。

**ROS 响应脂质体的摄取机制** 配制细胞数为每毫升 5×10<sup>5</sup> 个的 MCF-7 细胞悬液, 各取 3 mL 于 6 孔板中, 置于细胞培养箱孵育 12 h 使其贴壁。抑制剂组每孔分别加入 200 μL 不同抑制剂溶液阿米洛利 (amiloride, 100 μg·mL<sup>-1</sup>)、非律平 (filipin, 5 μg·mL<sup>-1</sup>) 和氯丙嗪 (chlorpromazine, 10 μg·mL<sup>-1</sup>), 对照组和 4 °C 组加入培养基 200 μL。细胞培养箱孵育 30 min,

然后加入 1 mL DLPC-PS-DOX (DOX 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 阿米洛利组、非律平组、氯丙嗪组 and 对照组放入 37  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱孵育 1 h, 4  $^{\circ}\text{C}$  组放入 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育 1 h。去除培养基, PBS 洗 3 次, 胰酶消化, 1000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 去除上清液, 加入 PBS 0.4 mL 将细胞反复吹打均匀, 利用流式细胞仪测定。

**光敏 ROS 响应脂质体细胞内 ROS 检测** DHE 能与活细胞内 ROS 发生氧化反应生成氧化乙啶, 氧化乙啶可作用于细胞 DNA, 产生红色荧光。根据活细胞内红色荧光的产生和强度, 可以判断 ROS 的含量有无和多少。取对数生长期 MCF-7 细胞, 以每毫升  $3\times 10^5$  个细胞数铺板于 24 孔板中, 12 h 细胞贴壁后, 更换培养基。给药, 继续孵育 6 h, 弃掉培养基, 换为 PBS, 光照组进行激光照射 (730 nm、1200  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 3 min), 照射后弃掉培养基, 立即加入 0.2 mL DHE 溶液 (15  $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min, PBS 洗涤 3 次, 用荧光显微镜观察细胞染色情况。

**光敏 ROS 响应脂质体的细胞毒性** 取对数期 MCF-7 细胞通过 CCK-8 法考察光照强度和 ROS 脂质体的细胞毒性。

**光照强度的细胞毒性** 取对数期 MCF-7 细胞消化计数, 稀释细胞悬液使得细胞数为每毫升  $5\times 10^4$  个, 在 96 孔板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 使得每孔 5 000 个细胞, 置于细胞培养箱孵育 12 h 或过夜, 使细胞贴壁。然后用 730 nm 激光分别以 0、50、100、300、500、1000 和 1200  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  照射 3 min, 接着放入细胞培养箱孵育 24 h, 弃掉培养基, 加入含 10% CCK-8 的培养基, 孵育 2 h, 然后将 96 孔板放于酶标仪上, 在 450 nm 波长处进行酶标仪读数, 测定光吸收值 (A)。按以下公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{未处理组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

**光敏 ROS 响应脂质体细胞毒性** 取对数期 MCF-7 细胞, 在 96 孔板中加入细胞数为每毫升  $5\times 10^4$  个的细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ , 置于细胞培养箱孵育 12 h 或过夜。弃掉培养基, 换为含药物的培养基, 接着放入细胞培养箱孵育 24 h, 弃掉培养基, 换为无药培养基, 接着光照组用 730 nm 激光 1200  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  照射 3 min, 放入细胞培养箱孵育 24 h, 弃掉培养基, 加入含 10% CCK-8 的培养基, 孵育 2 h, 然后将 96 孔板放于酶标仪上, 在 450 nm 波长处进行酶标仪读数, 测定 A。按公式 1 计算细胞存活率。

**统计学方法** 采用 GraphPad Prism 5.0 软件分析数据, 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。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。  $P < 0.05$  时有统计学差异。

## 结果

### 1 光敏剂的合成与鉴别

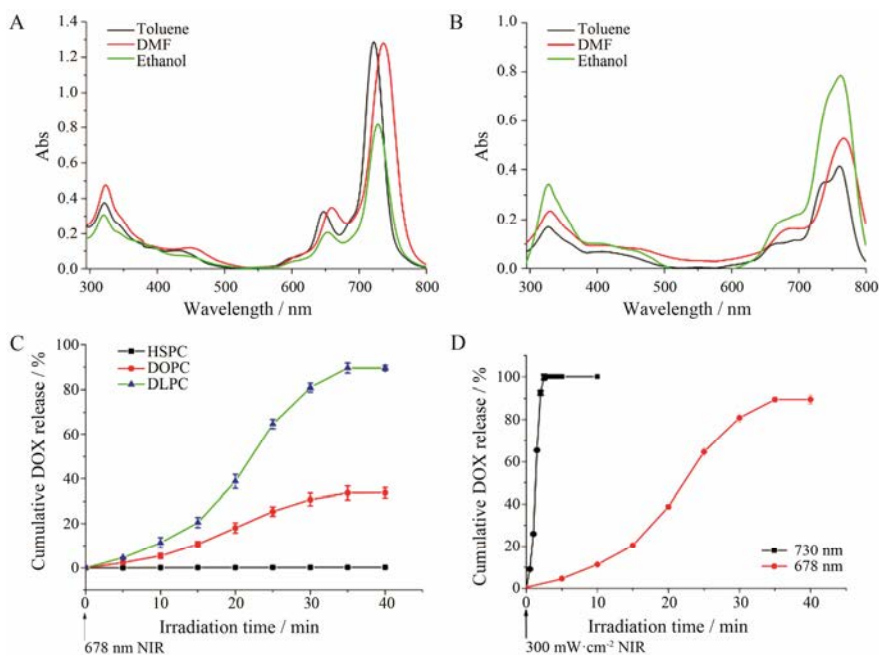
合成产物为绿色粉末, 易溶于甲苯、DMF 及氯仿。反应物光敏剂  $\text{H}_2\text{PC}(\text{OBU})_8$  和生成物  $\text{PdPC}(\text{OBU})_8$  氢原子环境相似, 核磁共振氢谱并不能很好地鉴别  $\text{PdPC}(\text{OBU})_8$ , 采用最大紫外吸收波长及质谱能很好鉴别。如图 1A 所示,  $\text{PdPC}(\text{OBU})_8$  在 DMF 溶液中的最大紫外吸收在 737 nm, 在甲苯中的最大紫外吸收在 722 nm, 在乙醇中的最大紫外吸收在 729 nm, 与文献<sup>[7]</sup>结果一致。因此, 鉴定生成物为  $\text{PdPC}(\text{OBU})_8$ , 产率约 70%。 $\text{H}_2\text{PC}(\text{OBU})_8$  在 DMF 溶液中的最大紫外吸收在 766 nm, 在甲苯中的最大紫外吸收在 761 nm, 在乙醇中的最大紫外吸收在 762 nm (图 1B)。经质谱扫描得到  $\text{PdPC}(\text{OBU})_8$  的  $[\text{M}+\text{H}]^+ \text{C}_{64}\text{H}_{81}\text{N}_8\text{O}_8^{106}\text{Pd}$  为 1195.6,  $\text{H}_2\text{PC}(\text{OBU})_8$  的  $[\text{M}+\text{H}]^+ \text{C}_{64}\text{H}_{83}\text{N}_8\text{O}_8$  为 1092.3。

### 2 光敏 ROS 响应脂质体的处方筛选

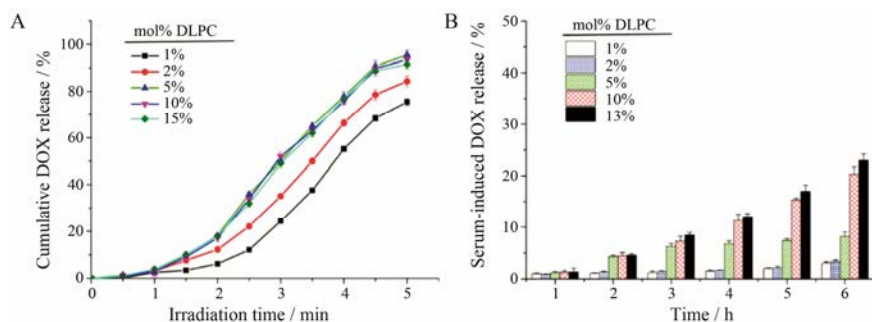
**2.1 磷脂的筛选** 如图 1C, HSPC 为饱和磷脂, 作为对照组, 由 HSPC 构成的脂质体在光照下 (678 nm、300  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) DOX 并没有释放, 由 DOPC 制备的脂质体在光照 35 min 后 DOX 释放约 40%, 由 DLPC 制备的脂质体在光照 35 min 后 DOX 释放达到 90%, 说明 DLPC 比 DOPC 具有更强的 ROS 响应活性。因此, 选择 DLPC 作为不饱和磷脂。

**2.2 光照波长的选择** 如图 1D 所示, 在相同光照强度下 (300  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), 678 nm 激光照射 40 min 后 DOX 基本释放完全, 而 730 nm 激光照射不到 5 min DOX 释放完全, 730 nm 波长激光实现了 DOX 的快速 ROS 响应释放。因此, 选择 730 nm 作为光照波长。

**2.3 光敏 ROS 响应脂质体中 DLPC 用量的筛选** DLPC 用量越多,  $\text{PdPC}(\text{OBU})_8$  的包封率和载药量逐渐下降, DOX 包封率和载药量基本保持不变 (表 1)。DOX 采用硫酸铵梯度法载入, DLPC 的用量不影响 DOX 包载。在一定范围内, DLPC 用量越大, DLPC 脂质体药物 ROS 响应释放越快, 当用量达到 5% 时, DLPC 脂质体药物的 ROS 响应速率不再加快 (图 2A)。DLPC 用量低时, DLPC 脂质体在血清中稳定, DOX 泄露少; DLPC 用量高时, DLPC 脂质体在血清中不稳定, DOX 泄露多 (图 2B)。综合以上结果, 考虑脂质体的包封率、ROS 响应释放速率及血清中的稳定性, 选择 DLPC 用量为 5%。



**Figure 1** UV-Vis absorption (Abs) of PdPC(OBu)<sub>8</sub> in different solvent (A). UV-Vis absorption of H<sub>2</sub>PC(OBu)<sub>8</sub> in different solvent (B). Cumulative doxorubicin hydrochloride (DOX) release of liposomes contained different unsaturated lipids after irradiation (678 nm, 300 mW·cm<sup>-2</sup>) (C). Reactive oxygen species (ROS) – responsive DOX release of LPD [liposome loaded with PdPC(OBu)<sub>8</sub> and DOX] upon different wavelength light irradiation (300 mW·cm<sup>-2</sup>) (D)



**Figure 2** Cumulative DOX release of liposomes contained different molar DLPC (A). Serum-induced DOX release of liposomes contained different molar DLPC (B)

**Table 1** Encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) of liposomes contained different molar 1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC)

DLPC /mol%	PdPC(OBu) <sub>8</sub>		DOX	
	EE/%	DL/%	EE/%	DL/%
1	92.23 ± 3.31	0.46 ± 0.01	93.33 ± 3.01	10.03 ± 0.35
2	93.73 ± 2.31	0.47 ± 0.00	94.90 ± 2.25	10.22 ± 0.26
5	84.43 ± 3.12	0.42 ± 0.01	91.03 ± 3.33	9.84 ± 0.40
10	74.29 ± 3.23	0.37 ± 0.01	92.34 ± 3.12	9.98 ± 0.37
15	65.13 ± 3.31	0.32 ± 0.01	91.20 ± 3.25	10.22 ± 0.36

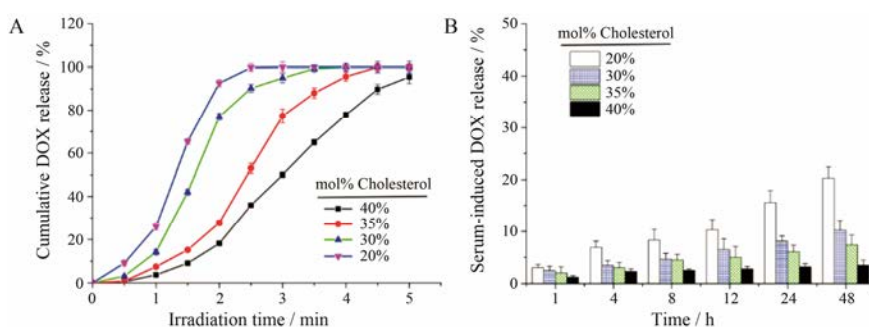
**2.4 光敏 ROS 响应脂质体中胆固醇用量的选择**  
胆固醇含量影响药物的包封率和载药量，同时影响脂质体的稳定性。由表 2 可知，胆固醇用量越高，PdPC(OBu)<sub>8</sub> 包封率越高，DOX 包封率也越高，这是因为脂质体中胆固醇含量越高，脂质体越稳定，药物

不容易释放，正如图 3A 所示，胆固醇用量越多，脂质体越稳定，这与脂质体在血清中的稳定性结论一致。脂质体在血清中越稳定，DOX 泄露越少 (图 3B)。因此，选择胆固醇用量为 40%。

**Table 2** Encapsulation efficiency and drug loading of liposomes contained different molar cholesterol (Chol)

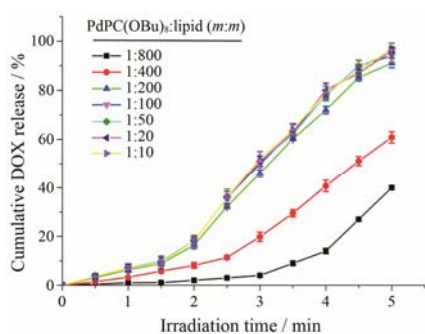
Chol /mol%	PdPC(OBu) <sub>8</sub>		DOX	
	EE/%	DL/%	EE/%	DL/%
20	72.96 ± 5.14	0.36 ± 0.01	70.03 ± 6.01	7.75 ± 0.71
30	79.10 ± 6.22	0.39 ± 0.02	82.22 ± 5.03	8.96 ± 0.60
35	80.45 ± 4.12	0.40 ± 0.01	91.86 ± 8.81	9.92 ± 1.05
40	84.43 ± 3.12	0.42 ± 0.01	91.03 ± 3.33	9.84 ± 0.40

**2.5 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 投药量的选择** PdPC(OBu)<sub>8</sub> 是产生 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 的物质，PdPC(OBu)<sub>8</sub> 越多，产生 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 越多。然



**Figure 3** Cumulative DOX release of liposomes contained different molar cholesterol (A). Serum-induced DOX release of liposomes contained different molar cholesterol (B)

而 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 越多, 包封率逐渐下降, 只有在低投药量时 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 包封率能达到制剂要求 (表 3)。在一定范围内, PdPC(OBu)<sub>8</sub> 投药量越高, DLPC 脂质体药物释放越快, 当 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 投药量达到质量比为 1 : 200 [PdPC(OBu)<sub>8</sub> : lipid] 后药物释放速率基本维持不变 (图 4)。因此, 选择 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 投药量的质量比为 1 : 200 [PdPC(OBu)<sub>8</sub> : lipid]。



**Figure 4** Cumulative DOX release of liposomes contained PdPC(OBu)<sub>8</sub>

### 3 光敏 ROS 响应脂质体的表征

**3.1 粒径与 zeta 电位** LPD 粒径为 (169.3 ± 1.2) nm, PDI 为 0.198 ± 0.003, 粒径均匀, zeta 电位为 (-39.8 ± 0.8) mV (图 5A)。BP 在 4 °C 冰箱保存 7 天粒径基本维持在 160 nm, PDI 基本维持在 0.1; LPD 粒径基本维持在 170 nm, PDI 基本维持在 0.2 (图 5B)。说明 ROS 响

应脂质体具有较好的储存稳定性。

**3.2 包封率与载药量** PdPC(OBu)<sub>8</sub> 的回归方程为  $A = 0.0743C - 0.0063$ , 相关系数为 0.9997, 线性范围为 1 ~ 10 μg · mL<sup>-1</sup>; DOX 的回归方程为  $F = 10.447C + 1.179$ , 相关系数为 0.9998, 线性范围为 0.1 ~ 12.5 μg · mL<sup>-1</sup>。PdPC(OBu)<sub>8</sub> 的包封率约为 (84.43 ± 3.12)%, 载药量为 (0.42 ± 0.01)%。在此条件下, DOX 包封率为 (91.03 ± 3.33)%, 载药量为 (9.84 ± 0.40)%。

**3.3 脂质体的形态** 由图 5C 可以看出, LPD 粒径约 150 nm, 光照前有一层透明似膜样的物质, 光照后膜消失 (图 5D), 这应该是光照产生 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 破坏了脂质体, 使得脂质体破裂形成。

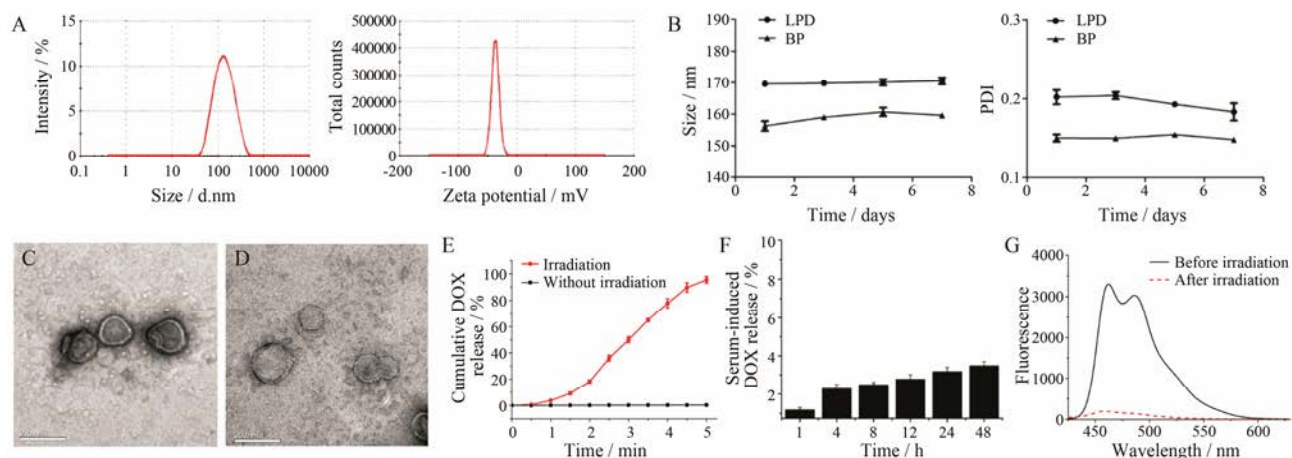
**3.4 光敏 ROS 响应脂质体药物的体外释放** LPD 在未光照的情况下, 药物基本不释放; 在光照的情况下, 5 min 药物释放率达到 95.5% ( $P < 0.05$ ), 说明 LPD 具有 ROS 响应快速释放药物的特性 (图 5E)。

**3.5 光敏 ROS 响应脂质体在血清中的稳定性** LPD 在血清中 48 h 后 DOX 泄露率小于 5%, 说明 LPD 具有良好的血清稳定性 (图 5F)。综上可知, LPD 具有较好的稳定性。

**3.6 脂质体溶液中 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 的检测** 由图 5G 可知, DPBF 在未光照前荧光强度达到 3000, 光照后荧光强度只有 250 左右, 说明光照后产生了大量的 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, 使 DPBF 的荧光强度显著下降。由此可知, LP 光照前不产生 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>,

**Table 3** Encapsulation efficiency and drug loading of liposomes contained PdPC(OBu)<sub>8</sub>

PdPC(OBu) <sub>8</sub> : lipid (m : m)	PdPC(OBu) <sub>8</sub>		DOX	
	EE/%	DL/%	EE/%	DL/%
1 : 800	92.12 ± 0.21	0.12 ± 0.00	91.13 ± 2.23	8.34 ± 0.20
1 : 400	93.73 ± 2.31	0.23 ± 0.00	94.90 ± 2.25	10.22 ± 0.26
1 : 200	84.43 ± 3.12	0.42 ± 0.01	91.03 ± 3.33	9.84 ± 0.40
1 : 100	38.45 ± 0.12	0.38 ± 0.00	91.86 ± 0.81	8.41 ± 0.05
1 : 50	15.73 ± 0.21	0.31 ± 0.00	89.94 ± 3.19	8.25 ± 0.37
1 : 20	7.40 ± 1.02	0.36 ± 0.05	90.23 ± 2.22	8.28 ± 0.19
1 : 10	3.73 ± 0.31	0.37 ± 0.03	88.90 ± 1.25	8.17 ± 0.11



**Figure 5** Particle sizes and zeta potential of ROS-responsive liposome (A). Storage stability of DOX-loaded ROS-responsive liposomes (B). Transmission electron microscopy (TEM) photos of ROS-responsive liposome before irradiation (20 000×) (C). TEM photos of ROS-responsive liposome after irradiation (20 000×) (D). Cumulative DOX release of DOX-loaded ROS-responsive liposomes (E). Serum stability of DOX-loaded ROS-responsive liposomes (F). Fluorescence intensity of 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) before or after PdPC(OBU)<sub>8</sub> liposome was irradiated (730 nm, 1 200 mW·cm<sup>-2</sup>, 3 min) (G)

光照后产生大量<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, 因此 ROS 响应脂质体在光照时有可能实现 ROS 响应。

#### 4 光敏 ROS 响应脂质体的细胞摄取

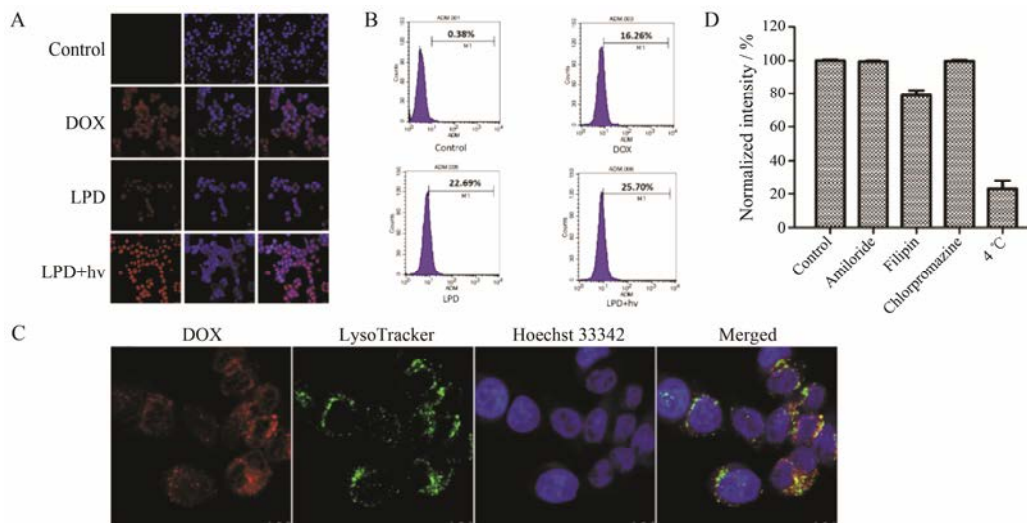
**4.1 共聚焦激光显微镜定性观察细胞摄取** DOX 作为脂质体中抗肿瘤药物, DOX 的摄取情况影响脂质体的药效。由图 6A 可知, 游离 DOX 的荧光最弱, 未光照处理的 LPD 荧光较强, 光照 (730 nm、1 200 mW·cm<sup>-2</sup>, 3 min) 处理的 LPD 荧光最强。说明与游离 DOX 摄取情况相比, 未光照处理的 LPD 摄取情况增强。光照后的 LPD 荧光最强可能是由于光照后使脂质体中 DOX 释放, 从而使得荧光增强。

**4.2 流式细胞仪定量观察细胞摄取** 由流式结果

(图 6B) 可知, DOX 的 M1 为 16.26%, 未光照处理的 LPD 的 M1 为 22.69%, 光照处理的 LPD 的 M1 为 25.70%, 未光照处理的 LPD 与光照处理的 LPD 的 M1 值分别是 DOX 的 M1 值的 1.40 倍和 1.58 倍 ( $P < 0.05$ )。综上, 光照处理的 LPD 摄取情况最好。

**4.3 ROS 响应脂质体在细胞内的分布** 如图 6C 所示, DOX 呈现红色荧光, 溶酶体呈现绿色荧光, 细胞核呈现蓝色荧光。图中黄色荧光是 DOX 的红色荧光与溶酶体的绿色荧光重叠形成的。说明 DOX 进入细胞后主要分布于溶酶体。

**4.4 ROS 响应脂质体的摄取机制** 由图 6D 可知, 非律平抑制剂组的 DOX 相对摄取量为 (78 ± 3)%, 相对



**Figure 6** DOX uptake of ROS-responsive liposome by confocal microscopy (A). DOX uptake of ROS-responsive liposome by flow cytometry (B). Co-localization of ROS-responsive liposome within the lysosomes (C). Relative intensities of DOX from ROS-responsive liposome internalized by MCF-7 cells (D)

于对照组下降约 20%，说明非律平抑制剂显著抑制了 DOX 在 MCF-7 细胞的摄取 ( $P < 0.05$ ), 从而得出 LPD 进入细胞是通过小窝蛋白内吞进入。4 °C 组的 DOX 相对摄取量为 (20±5)%, 相对于对照组下降了 80%, 说明 LPD 摄取需要能量。综上, LPD 进入细胞的内吞途径是通过小窝蛋白介导的能量依赖型。

### 5 光敏 ROS 响应脂质体细胞内 ROS 检测

由图 7 可知, PBS 光照前、光照 (730 nm、1200 mW·cm<sup>-2</sup>, 3 min) 均没有红色荧光, 说明 PBS 在光照前后都不产生 ROS。LP 在 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 质量浓度为 0.1 μg·mL<sup>-1</sup> 时基本看不到红色荧光, 说明 LP 在 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 为 0.1 μg·mL<sup>-1</sup> 时不产生 ROS, 随着 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 浓度逐渐升高, LP 的红色荧光逐渐增强, 说明即使在不光照时, PdPC(OBu)<sub>8</sub> 浓度越高, 产生的 ROS 越多。LP 在 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 为 0.1 μg·mL<sup>-1</sup> 时光照后具有明显的红色荧光, 说明 LP 光照后产生大量的 ROS, 同理, 在光照的情况下, PdPC(OBu)<sub>8</sub> 浓度越高, 产生的 ROS 越多。综上说明, PdPC(OBu)<sub>8</sub> 脂质体在活细胞内能产生少量 ROS, 光照后产生大量 ROS。

### 6 光敏 ROS 响应脂质体的细胞毒性

#### 6.1 光照强度的细胞毒性

光照强度对 MCF-7 细胞没有毒性。实验表明, 即使光照强度达到 1200 mW·cm<sup>-2</sup>, 激光照射 3 min, MCF-7 细胞存活率大于 90%, 说明光照强度达到 1200 mW·cm<sup>-2</sup> 依然对 MCF-7 细胞没有毒性。因此, 1200 mW·cm<sup>-2</sup> 可以作为细胞实验激光照射的光照强度 (图 8A)。

#### 6.2 光敏 ROS 响应脂质体细胞毒性

LP 在光照前对 MCF-7 细胞具有毒性, IC<sub>50</sub> 为 1.314 μg mL<sup>-1</sup>; 光照后细胞毒性显著增强, IC<sub>50</sub> 为 0.204 μg mL<sup>-1</sup> (图 8B), 光照后 LP 的 IC<sub>50</sub> 下降 84.5% ( $P < 0.05$ )。说明光照能使 LP 细胞毒性加强, 然而光照本身对细胞没有毒性, 此结果应该是光照与 LP 发生反应, 从而产生更强的细胞毒性。已有大量文献<sup>[17]</sup>报道光敏剂在光照后会产生 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, 产生的 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 具有杀死细胞的作用, 这个作用称为光动力治疗。由此可见, LP 在光照后产生 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, 从而增强细胞毒性。这与体外 ROS 水平检测一致, LP 光照后会产生 ROS。

DOX 是抗肿瘤药物, 游离 DOX 的 IC<sub>50</sub> 为 0.280 μg·mL<sup>-1</sup>, LPD 未光照时的 IC<sub>50</sub> 为 0.090 μg·mL<sup>-1</sup>, 光照后 IC<sub>50</sub> 为 0.040 μg·mL<sup>-1</sup> (图 8C)。未光照的 LPD 与光照的 LPD 的 IC<sub>50</sub> 分别比 DOX 的 IC<sub>50</sub> 下降 67.9% 和 84.7% ( $P < 0.05$ )。未光照时 LPD 比 DOX 的 IC<sub>50</sub> 值低, 说明 LPD 细胞毒性强于 DOX; LPD 光照时比未光照时具有更低的 IC<sub>50</sub> 值, 说明 LPD 光照后细胞毒性作用更强。因此 LPD 光照后具有最强的细胞毒性作用。

### 讨论

本文首先采用硫酸铵梯度法制备了具有光敏剂 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 与 DOX 的光敏 ROS 响应脂质体。以药物包封率、载药量、ROS 响应速率和血清中稳定性为指标, 考察了不同磷脂、不同激光波长、DLPC 用量、胆固醇用量和 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 投药量对脂质体的影

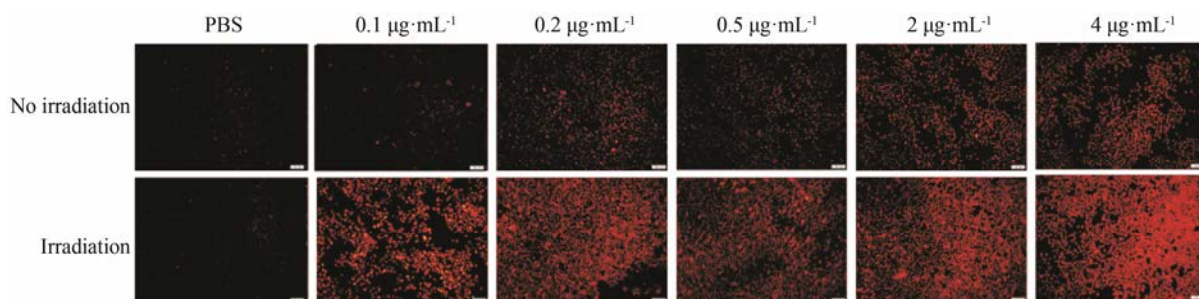


Figure 7 Dihydroethidium (DHE) staining of ROS-responsive liposome

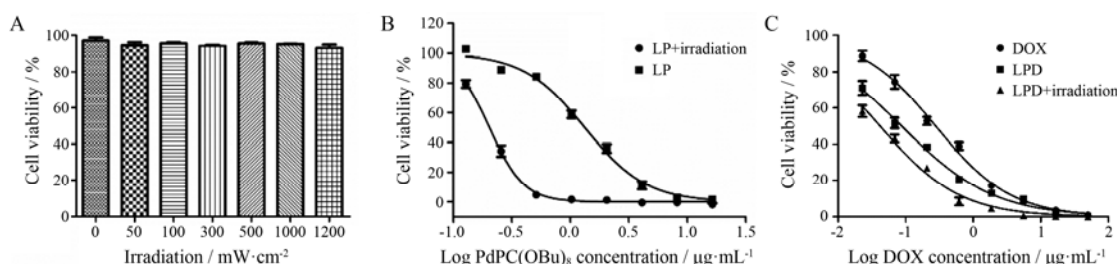


Figure 8 Cytotoxicity of different irradiation intensity (A). Cytotoxicity of liposome loaded with PdPC(OBu)<sub>8</sub> (LP) on MCF-7 cells (B). Cytotoxicity of DOX or LPD on MCF-7 cells (C)

响, 最终确定了最优处方, 即 5% DLPC、40% 胆固醇和 1:200 药脂比的 PdPC(OBu)<sub>8</sub> 投药量。LPD 在 678 nm 以 300 mW·cm<sup>-2</sup> 光照强度照射 40 min 后 DOX 释放率达到 90%, 在 730 nm 以相同光照强度照射 5 min 后 DOX 释放率达到 95.5%。因此, 选择 730 nm 作为激光照射波长。然而 LPD 在不光照的情况下 DOX 基本不释放, 说明 LPD 具有光敏性, 光照可以控制药物释放。对 LPD 的光敏释放机制进行研究发现, LPD 在光照后产生大量 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 作用于脂质体膜, 不可逆破坏其化学结构, 增强脂质体磷脂双分子层的通透性, 从而释放药物<sup>[18]</sup>。因此 LPD 具有 ROS 响应特性。

LPD 的摄取发现, LPD 光照后能显著增强 DOX 的荧光, 说明光照能促进 LPD 中 DOX 释放。最后检测细胞内 ROS 发现, ROS 响应脂质体在光照后能产生大量 ROS。进一步研究 LPD 的细胞毒性实验表明未光照 LPD 的 IC<sub>50</sub> 较游离 DOX 下降 67.9%, 光照的 LPD 的 IC<sub>50</sub> 较游离 DOX 下降 85.7%, 说明光照能显著增强 LPD 的细胞毒性, 这是 LPD 光照后产生 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 具有光动力治疗作用, 因此 LPD 光照后细胞毒性显著增强<sup>[19]</sup>。

总之, 本研究初步证明了 LPD 具有 ROS 响应特性, 能够增强细胞毒性, 增强细胞摄取, 同时具有光动力治疗、化疗与光敏释药的作用, 具有潜在的抗肿瘤作用。今后尚待进一步考察 LPD 在动物体内的靶向性、药动学参数、安全性及体内抗肿瘤活性。

## References

- [1] Lee ES, Na K, Bae YH. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor [J]. *J Control Release*, 2005, 103: 405–418.
- [2] Li J, Yin T, Wang L, et al. Biological evaluation of redox-sensitive micelles based on hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for tumor-specific delivery of paclitaxel [J]. *Int J Pharm*, 2015, 483: 38–48.
- [3] Timko BP, Arruebo M, Shankarappa SA, et al. Near-infrared-actuated devices for remotely controlled drug delivery [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 1349–1354.
- [4] Landon CD, Park JY, Needham D, et al. Nanoscale drug delivery and hyperthermia: the materials design and preclinical and clinical testing of low temperature-sensitive liposomes used in combination with mild hyperthermia in the treatment of local cancer [J]. *Open Nanomed J*, 2011, 3: 38–64.
- [5] Poole KM, Nelson CE, Joshi RV, et al. ROS-responsive microspheres for on demand antioxidant therapy in a model of diabetic peripheral arterial disease [J]. *Biomaterials*, 2015, 41: 166–175.
- [6] Song CC, Du FS, Li ZC. Oxidation-responsive polymers for biomedical applications [J]. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 3413–3426.
- [7] Rwei AY, Lee JJ, Zhan C, et al. Repeatable and adjustable on-demand sciatic nerve block with phototriggerable liposomes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 15719–15724.
- [8] Lee SH, Gupta MK, Bang JB, et al. Current progress in reactive oxygen species (ROS)-responsive materials for biomedical applications [J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2: 908–915.
- [9] Lu GZ, Hou C, Zhong YQ, et al. Recent progress of reactive oxygen species-responsive drug delivery systems [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 206–213.
- [10] Shim MS, Xia Y. A reactive oxygen species (ROS)-responsive polymer for safe, efficient, and targeted gene delivery in cancer cells [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 6926–6929.
- [11] Ma N, Li Y, Ren H, et al. Selenium-containing block copolymers and their oxidation-responsive aggregates [J]. *Polym Chem*, 2010, 1: 1609–1614.
- [12] Cao W, Gu Y, Li T, et al. Ultra-sensitive ROS-responsive tellurium-containing polymers [J]. *Chem Commun*, 2015, 51: 7069–7071.
- [13] Randles EG, Bergethon PR. A photodependent switch of liposome stability and permeability [J]. *Langmuir*, 2013, 29: 1490–1497.
- [14] Luo D, Li N, Carter KA, et al. Rapid light-triggered drug release in liposomes containing small amounts of unsaturated and porphyrin-phospholipids [J]. *Small*, 2016, 12: 3039–3047.
- [15] Wei S, Zhou J, Huang D, et al. Synthesis and type I/type II photosensitizing properties of a novel amphiphilic zinc phthalocyanine [J]. *Dyes Pigments*, 2006, 71: 61–67.
- [16] Sharman WM, van Lier JE. Synthesis and photodynamic activity of novel asymmetrically substituted fluorinated phthalocyanines [J]. *Bioconjug Chem*, 2005, 16: 1166–1175.
- [17] Hou Z, Deng K, Li C, et al. 808 nm Light-triggered and hyaluronic acid-targeted dual-photosensitizers nanoplatfrom by fully utilizing Nd<sup>3+</sup>-sensitized upconversion emission with enhanced anti-tumor efficacy [J]. *Biomaterials*, 2016, 101: 32–46.
- [18] Meng QS, Zhang PC, Yin Q, et al. Photo-sensitive liposomes loading doxorubicin hydrochloride reverse drug resistance of breast cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 809–820.
- [19] Wang X, Meng G, Zhang S, et al. A reactive <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-responsive combined treatment system of photodynamic and chemotherapy for cancer [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29911.