

## 载吲哚菁绿和多柔比星自组装胶束的构建及体外抗肿瘤及其转移的评价

唐嘉婧, 梅 凌, 余倩雯, 何 勤\*

(四川大学华西药学院, 靶向药物与传递系统教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

**摘要:** 本研究通过 pH 敏感的酰胺键共价连接疏水性化疗药物多柔比星 (doxorubicin, DOX) 和亲水性抗肿瘤转移的低分子量肝素 (low molecular weight heparin, LH) 合成了低分子量肝素-多柔比星胶束 (LH-DOX), 并物理包载光热剂吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG), 以透析法制备了具有 pH 敏感的载吲哚菁绿的低分子量肝素-多柔比星聚合物胶束 (LH-DOX/ICG)。该胶束粒径为  $(148.7 \pm 2.1)$  nm, 在电镜下呈形态规则的球形, 粒径均一, 并具有良好的稳定性和生物相容性。体外释放结果显示, DOX 的释放具有 pH 敏感性, ICG 有一定的缓释效果。ICG 包载于胶束后与游离 ICG 具有相似的光热效应。一方面, 划痕愈合实验显示, 在激光照射下 LH-DOX/ICG 胶束具有良好的抗肿瘤转移能力; 另一方面, 细胞凋亡及细胞毒性实验表明, 在激光照射下该胶束诱导黑色素瘤 B16F10 细胞凋亡的能力和对细胞毒性作用明显增加。因此, LH-DOX/ICG 胶束具有良好的前景, 用于光疗-化疗联合治疗黑色素瘤。

**关键词:** 胶束; 低分子量肝素; 肿瘤治疗; 药物递送

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 12-1933-09

## Preparation and evaluation of anti-tumor metastasis of self-assembly micelles loaded with indocyanine green *in vitro*

TANG Jia-jing, MEI Ling, YU Qian-wen, HE Qin\*

(Key Laboratory of Drug Targeting and Drug Delivery Systems, Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** In this study, we used low molecular weight heparin (LH) as hydrophilic sides, doxorubicin (DOX) as hydrophobic sides, and indocyanine green (ICG) as a photosensitive drug to prepare pH-sensitive self-assembled polymeric micelles (LH-DOX/ICG). The micelles were prepared by dialysis, and evaluated for stability, pH sensibility *in vitro*, hemolytic test and photo-thermal effect. Wound healing test was used to evaluate the anti-metastatic effects. MTT assay and apoptosis detection kit were used to evaluate the cytotoxicity of micelles against melanoma B16F10 cells. The size of the micelles was  $(148.7 \pm 2.1)$  nm and the zeta potential was  $(-30.7 \pm 1.1)$  mV. The drug-loading content of DOX and ICG were 11.82% and 5.59%, respectively. The micelles exhibited spherical in shape, fairly uniform size. The micelles were stable within 48 h in 50% fetal bovine serum phosphate buffer. The release of DOX was pH-sensitive, while the release of ICG was sustained. The micelles were biocompatible and safe as indicated by the hemolytic test. *In vitro* photo-thermal effect indicated LH-DOX/ICG micelles had similar photo-thermal effect to the free ICG. Wound healing test showed that the micelles had a good ability to inhibit tumor migration with laser irradiation. MTT assay and cell

收稿日期: 2017-08-31; 修回日期: 2017-09-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773658).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-28-85502532, E-mail: qinhe@scu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0848

apoptosis assay indicated that LH-DOX/ICG micelles displayed more efficient anti-tumor effect after near infrared laser compared to LH-DOX micelles. LH-DOX/ICG micelles are promising for the therapeutic effect of phototherapy and chemotherapy in combination for melanoma.

**Key words:** micelle; low molecular weight heparin; cancer therapy; drug delivery

当温度上升至 43 °C 时, 热能使细胞受损。光热治疗 (photo-thermal therapy, PT) 作为一种治疗恶性肿瘤的新方法, 即利用光热转换效率高的光热剂, 在外部光源 (一般是近红外光) 的照射下将光能转化为热能, 进而杀死肿瘤细胞, 一般光照时间短, 材料无毒无害, 具有很大的发展潜力<sup>[1]</sup>。吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 是一种合成的三羧花菁系的小分子光热剂, 能高效地将光能转化成热能, 是目前唯一被美国食品药品监督管理局批准用于临床的成像试剂, 其光热转换能力使其在肿瘤光热疗法中运用广泛<sup>[2]</sup>。大量研究表明, 光热疗法和化疗的联用能协同诱导肿瘤细胞的凋亡和坏死, 近年来越来越受到研究者的关注。Tang 等<sup>[3]</sup>发现游离的 ICG 与多柔比星 (doxorubicin, DOX) 联用后对肿瘤细胞的杀伤作用最强。但 ICG 血浆半衰期极短, 只有 2~4 min, 进入血液循环后 98% ICG 会迅速结合血浆蛋白, 被肝脏代谢<sup>[4]</sup>。为了延长游离药物的体内循环时间, 增加其肿瘤蓄积浓度, 可以设计合适的纳米递药系统通过增强的渗透和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 提高药物在肿瘤部位的蓄积, 减少毒副作用。因此, 构建生物相容性良好的负载 ICG 的载体, 具有十分重要的意义。

相较于人工合成材料, 一些天然多糖如透明质酸、壳聚糖和肝素等由于其无免疫原性和无毒性被越来越多地用于制备纳米粒<sup>[5]</sup>。肝素作为内源聚阴离子, 具有良好的生物相容性, 可降解性以及亲水性。大量文献报道, 肝素及其衍生物不仅具有抗凝血功能, 还具有抑制新生血管和抗肿瘤转移等作用<sup>[6]</sup>。但普通未分级肝素容易引起出血和血小板减少的症状, 临床应用受到了一定限制。与之相比, 低分子量肝素 (low molecular weight heparin, LH) 由普通肝素经降解处理, 分子量更小, 安全性大大提高, 同时具有与普通肝素相似的抗肿瘤转移活性<sup>[7]</sup>。另外, 临床研究表明, 低分子量肝素通过抑制肿瘤细胞的迁移和黏附, 能明显延长癌症患者生存期<sup>[8]</sup>。

聚合物胶束作为一种有效的抗肿瘤药物载体, 能够装载疏水性抗肿瘤药物并靶向递送至肿瘤部位, 减少在其他部位蓄积, 并保护药物在生物介质中不被降解, 进而提高治疗效果<sup>[9]</sup>。在本实验室的前期研

究中, 曾将 LH 与 DOX 通过 pH 敏感酰胺键相连, 得到具有抗肿瘤及抗转移功能的 LH-DOX 聚合物胶束<sup>[10]</sup>。基于此, 本课题将光热剂 ICG 物理包载于聚合物胶束 LH-DOX 中, 得到 LH-DOX/ICG 胶束, 该胶束在激光照射下, 光热剂 ICG 产生高热效应, 使肿瘤细胞凋亡, 从而发挥光热治疗和化学治疗的协同作用。本文构建并表征了 LH-DOX/ICG 胶束, 初步评价了其对于黑色素瘤细胞的抗肿瘤及抗转移活性。

## 材料与方法

**材料** 低分子量肝素 (LH)、多柔比星 (DOX) (大连美仑生物技术有限公司); 吲哚菁绿 (ICG, 日本 Tokyo Chemical Industry 公司); 6-氨基乙酸、氯化亚砷 (北京百灵威科技有限公司); 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (成都贝斯特试剂有限公司); B16F10 鼠源性黑色素瘤细胞 (中国科学院上海细胞生物学研究所); DMEM 培养基、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司); 青霉素-链霉素溶液、3-(4,5-二甲基噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) (碧云天生物技术有限公司); Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒 (上海翊圣生物科技有限公司); Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司); 其他试剂均为市售分析纯。

**仪器** 电子分析天平 (BT 25S, 德国 Sartorius 公司); NanoSZ900 激光纳米粒度及电位分析仪 (Nano ZS90, 英国 Malvern 公司); 透射电子显微镜 (JEM-100SX, 日本 JEOL 公司); 化学发光仪 (Varioskan Flash instrument, 美国 Thermo Scientific 公司); 红外二极管激光器 (MDL-III-808, 长春新产业光电技术有限公司); 二氧化碳培养箱 (Forma 311, 美国 Thermo Fisher 公司); 恒温空气摇床 (ZHWHY-100H, 上海智城分析仪器制造有限公司); 冷冻离心机 (Centrifuge 5415R, 德国 Eppendorf 公司); 倒置显微镜 (40CFL Axiovert 40, 德国 Carl Zeiss 公司); 激光扫描共聚焦显微镜 (FV 1000, 日本 Olympus 公司); 流式细胞仪 (Cytomics™ FC500, 美国 Beckman Coulter 公司)。

**pH 敏感胶束材料 LH-DOX 的合成** LH-DOX

胶束的合成参考本实验前期的研究<sup>[10]</sup>。氨基己酸乙酯(linker)的合成: 三口瓶中加入无水乙醇 50 mL, 冰浴下滴加重蒸的  $\text{SOCl}_2$  5 mL。逐步加入氨基己酸 13.1 g, 升温至 75 °C 左右, 回流反应 7 h, 减压蒸出过量的  $\text{SOCl}_2$  和乙醇, 残余物固化, 重结晶后得白色固体。

**Linker 酰肼的合成** 精密称取氨基己酸乙酯 414.5 mg, 溶于 10 mL 无水乙醇中, 加入 80% 水合肼 80  $\mu\text{L}$ , 70 °C 避光反应 6 h, 得粗品。过硅胶柱分离得纯品。

**Linker-DOX 片段的合成** 精密称取 DOX 15.0 mg, 溶于 5 mL 甲醇中, 充分溶解后加入 linker 酰肼, 缓慢滴加三氟醋酸 20  $\mu\text{L}$ , 室温避光反应 24 h, 减压蒸出过量的甲醇, 得粗品, 过柱分离得纯品。

**低分子量肝素-多柔比星 (LH-DOX) 的合成** 低分子量肝素于甲酰胺中溶解, 加适量 EDC, NHS 避光反应 6 h, 加入疏水片段 linker-DOX, 避光反应 48 h, 最终合成胺键连接的两亲性聚合物。

**载吡啶菁绿胶束 (LH-DOX/ICG) 的制备** 将 ICG 的 DMSO 溶液 (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 滴加到 LH-DOX 的 DMSO 溶液 (5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 中, 滴加完毕后搅拌 2 h 保证与胶束充分作用, 透析 12 h 后冻干。

**粒径、电位及形态学观察** 取上述条件下制备的 LH-DOX/ICG 100  $\mu\text{L}$ , 用纯水稀释至 1 mL, 采用激光纳米粒度及电位分析仪测定其粒径和 zeta 电位。另取适量 LH-DOX/ICG 样品, 滴在覆有支持膜的铜网上, 用 2% 磷钨酸负染干燥后置于透射电镜下拍照。

**载药量和包封率的测定** 配制质量浓度为 0.05、0.20、0.25、0.5、1.0、2.5 和 5.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DOX 溶液, 于化学发光仪 ( $E_x=470\text{ nm}$ ,  $E_m=590\text{ nm}$ ) 测量其荧光强度, 并绘制标准曲线。配制质量浓度为 1.25、2.5、5.0、7.5、10.0、15.0 和 20.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ICG, 于紫外分光光度计 (779 nm) 测量其吸光度值, 并绘制标准曲线。取适量 LH-DOX/ICG 样品, 加入一定量的纯水稀释后, 分别测定 DOX 的荧光强度和 ICG 的吸光度, 并用上述实验所得标准曲线计算 ICG 和 DOX 的浓度、载药量及包封率。载药量=载体中 ICG 或 DOX 的质量/总质量 $\times 100\%$ ; 包封率=载体中 ICG 的质量/ICG 总量 $\times 100\%$ 。

**血清稳定性考察** 将各组胶束分别与等体积的 FBS 混合均匀, 并置于 37 °C 恒温空气摇床中缓慢振摇, 分别于 0、2、4、6、8、12、24 和 48 h 取样, 经化学发光仪测定样品在 750 nm 波长处的透光率。

**体外释放实验<sup>[11]</sup>** DOX 释放的考察: 取已知浓度的 LH-DOX/ICG 胶束 0.4 mL, 置于透析袋 (分子

质量 8~14 kDa) 中, 用夹子夹闭透析袋, 并将其置于装有 40 mL、pH 分别为 5.0、6.5 和 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的离心管中, 将离心管置于空气摇床中, 在 37 °C、60  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下振摇。在 0.5、1、2、4、6、8、12、24 和 48 h 取出 0.1 mL 介质留样检测, 同时补充等温等体积介质。所得样品稀释同等倍数后, 所得样品用化学发光仪测定荧光强度 ( $E_x=470\text{ nm}$ ,  $E_m=590\text{ nm}$ ), 并计算 DOX 的浓度, 绘制释放曲线。

**ICG 释放的考察:** 将已知浓度的 LH-DOX/ICG 胶束分成若干等份后, 分别放入透析袋中, 并置于 10% 胎牛血清 (FBS) 和 PBS (pH 7.4) 的释放介质中避光震荡, 于特定时间点取出一个透析袋, 将胶束溶液加入适量甲醇破坏, 游离出所负载的 ICG。用紫外分光光度计测定吸光度 (779 nm), 并计算 ICG 的浓度, 绘制释放曲线。ICG 的释放率 =  $(M_0 - M_{\text{sample}}) / M_0 \times 100\%$ , 其中  $M_{\text{sample}}$  和  $M_0$  分别代表特定时间测出的 LH-DOX/ICG 胶束中残余 ICG 的量和加入已知浓度的 LH-DOX/ICG 胶束中 ICG 量。

**溶血性考察<sup>[12]</sup>** 取健康 BALB/c 小鼠全血, 3000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃去上清液, 细胞沉淀用 PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次, 直至上清液不再显红色。用 PBS 将其配制成 2% 红细胞悬液备用。用 PBS 将 LH-DOX 和 LHDOX/ICG 胶束分别稀释成浓度为 1500、750、375、187.5、93.75 和 46.875  $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$  溶液, 并取以上两组不同浓度的胶束溶液 0.5 mL, 与等体积 2% 红细胞悬液充分混匀作为实验组。另取 2% 红细胞悬液 0.5 mL, 分别加入等体积的 PBS 和超纯水, 作为阴性对照组和阳性对照组。每组平行 3 份, 在 37 °C 摇床中孵育 1 h 后, 取出离心 (3000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10 min), 沉淀的红细胞用 PBS 分散后, 于显微镜下观察其形态。将上清液加入 96 孔板中, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 于化学发光仪测定吸光度 (540 nm), 按以下公式计算: 溶血率 =  $(A_{\text{sample}} - A_{(-)\text{control}}) / (A_{(+)\text{control}} - A_{(-)\text{control}})$ 。其中,  $A_{\text{sample}}$ 、 $A_{(-)\text{control}}$  和  $A_{(+)\text{control}}$  分别表示样品、阴性对照组和阳性对照组在 540 nm 处的吸光度值。

**体外光热效应的考察** 分别配制 ICG、LH-DOX 和 LH-DOX/ICG 样品溶液 (ICG 浓度为 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 在外部近红外光源 (808 nm、2W $\cdot\text{cm}^{-2}$ ) 照射 300 s, 同时采用电子温度计测量溶液温度。自 0 s 开始, 每间隔 25 s 读取并记录各样品温度。

**划痕愈合实验** 采用细胞划痕愈合法评价 LH-DOX/ICG 胶束对细胞迁移运动与修复能力的影响。B16F10 细胞以  $3\times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板内, 24 h 后, 在 6 孔板的单层贴壁细胞上, 用 200  $\mu\text{L}$  的枪头

在细胞生长的中央区域划线, 去除中央部分的细胞, 用 PBS 清洗 3 次, 将含有 LH-DOX ( $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DOX)、LH-DOX/ICG ( $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DOX、 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ICG) 和 LH-DOX 与 ICG 的混合溶液 ( $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DOX、 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ICG) 的培养基分别加入各孔内。孵育 6 h 后, 对激光照射组进行激光处理 ( $808 \text{ nm}$ 、 $2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 300 s), 随后继续孵育; 无激光照射组不处理。当孵育总时间达到 12 h 时, 取出 6 孔板, 在显微镜下观察划痕边界并拍照记录, 用 Image J 测量各组划线之间的距离并计算迁移率。迁移率计算公式如下: 迁移率  $= (D_{0\text{h}} - D_{12\text{h}}) / D_{0\text{h}} \times 100\%$ , 其中  $D_{0\text{h}}$ 、 $D_{12\text{h}}$  分别为 0、12 h 的各组划痕之间的距离。

**细胞毒性实验** 用 DMEM 培养基分别配制 DOX 质量浓度为 0.1、0.8、4 和  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  游离 DOX、LH-DOX、LH-DOX/ICG 溶液及 LH-DOX 与 ICG 的混合溶液备用。将 B16F10 细胞以  $2 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 移除培养基后加入上述系列浓度的含有 DOX 溶液。其中 LH-DOX+ICG+laser 与 LH-DOX/ICG+laser 组给予  $808 \text{ nm}$ 、 $2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$  激光辐射 300 s。24 h 时, 移除培养基, 用冷 PBS 洗涤, 每孔加入无血清 DMEM 培养基  $150 \mu\text{L}$  和  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  MTT 溶液  $20 \mu\text{L}$ 。37 °C 孵育 4 h 后, 移除培养基, 每孔加入 DMSO  $200 \mu\text{L}$ , 在 37 °C、 $70 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  摇床中孵育 30 min。用化学发光仪在 490 nm 处测定各孔的吸光度 ( $A_{\text{实验}}$ ), 以 DMSO 溶液的孔作为空白 ( $A_{\text{空白}}$ ), 以给药的孔作为对照组 ( $A_{\text{对照}}$ ), 测量并计算每孔的细胞存活率。公式如下: 存活率  $= (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

**细胞凋亡实验** 采用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒和 Calcein-AM/PI 双染试剂盒考察各组胶束诱导 B16F10 细胞凋亡的能力。将 B16F10 细胞以  $3 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板内, 培养 24 h 后, 将含有 LH-DOX ( $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DOX)、LH-DOX/ICG ( $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DOX、 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ICG) 的培养基分别加入各孔内, 每组分别设置 3 个复孔。孵育 6 h 后, 对激光照射组进行激光处理 ( $808 \text{ nm}$ 、 $2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 300 s), 随后继续孵育。当孵育总时间达到 12 h 时, 将两组的细胞分别消化, 用冷 PBS 洗涤, 加入  $100 \mu\text{L}$  binding buffer 重悬细胞, 并依次加入 Annexin V-FITC  $5 \mu\text{L}$  和 PI  $5 \mu\text{L}$ , 混合均匀后室温避光染色 15 min, 通过流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

B16F10 细胞以  $3 \times 10^5$  个/孔接种于铺有盖玻片的 6 孔板内。孵育 24 h 后, 将含有 LH-DOX ( $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

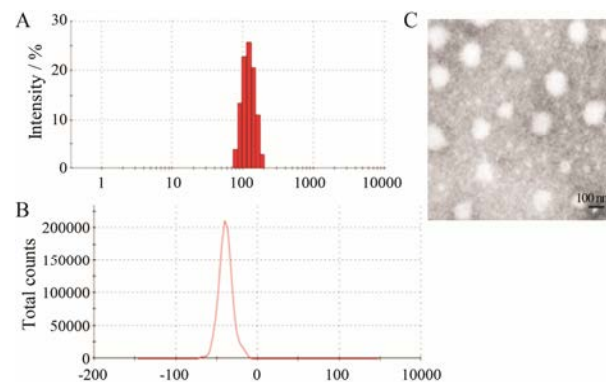
DOX)、LH-DOX/ICG ( $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DOX、 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ICG) 和 LH-DOX 与 ICG 的混合溶液 ( $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DOX、 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ICG) 的培养基分别加入各孔内, 每组分别设置 3 个复孔。孵育 6 h 后, 对激光照射组进行激光处理 ( $808 \text{ nm}$ 、 $2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 300 s), 随后继续孵育。当孵育总时间达到 12 h 时, 用 PBS 洗涤 3 次后, 每孔加入  $400 \mu\text{L}$  Calcein-AM/PI 工作液染色 15 min, 在激光共聚焦显微镜下拍摄记录各组的凋亡情况。

**统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 粒径、电位及形态学观察

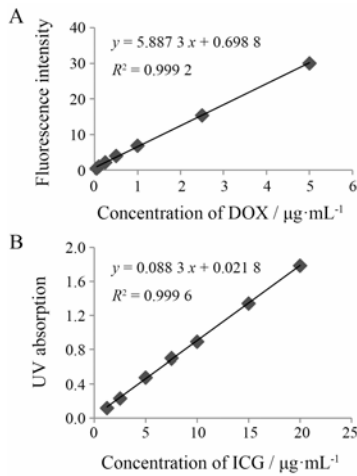
所制备的 LH-DOX/ICG 胶束表征如图 1 所示, 胶束的粒径为  $(148.7 \pm 2.1) \text{ nm}$ , zeta 电位为  $(-30.7 \pm 1.1) \text{ mV}$ , 呈负电性。在透射电镜 (TEM) 下可见, 胶束大小均一, 形状规则, 大多呈类球形。



**Figure 1** Dynamic light scattering (DLS) analysis (A, B). The transmission electron microscopy (TEM) image of heparin-doxorubicin/indocyanine green (LH-DOX/ICG) micelles (C)

### 2 载药量和包封率的测定

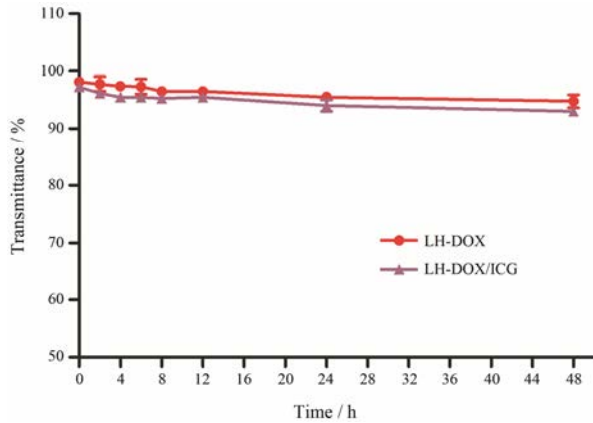
分别用化学发光仪和紫外分光光度计测量并绘制 DOX 和 ICG 的标准曲线, 如图 2 所示。DOX 的标准曲线为  $y = 5.8873x + 0.6988$ ,  $R^2 = 0.9992$ , 表明在  $0.05 \sim 5.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内 DOX 线性关系良好; ICG 的标准曲线  $y = 0.0883x + 0.0218$ ,  $R^2 = 0.9996$ , 表明在  $1.25 \sim 20.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内 ICG 线性关系良好。分别测定 LH-DOX/ICG 胶束中 DOX 和 ICG 的荧光强度和吸光度值, 计算得到 DOX 的载药量为  $(11.82 \pm 1.30)\%$ , ICG 的载药量和包封率分别为  $(5.59 \pm 0.91)\%$  和  $(85.63 \pm 3.62)\%$ 。



**Figure 2** The standard curves of DOX (A). The standard curves of ICG (B).  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 胶束在血清中的稳定性

通过浊度法评价胶束在血清中的稳定性。如图3所示, LH-DOX、LH-DOX/ICG 胶束与 50% FBS 共孵育后, 48 h 内均无明显聚集或沉淀形成, 透光率均在 90% 以上, 表明两种胶束均具有良好的血清稳定性。



**Figure 3** The variations of transmittance of different micelles in 50% FBS phosphate buffer.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$

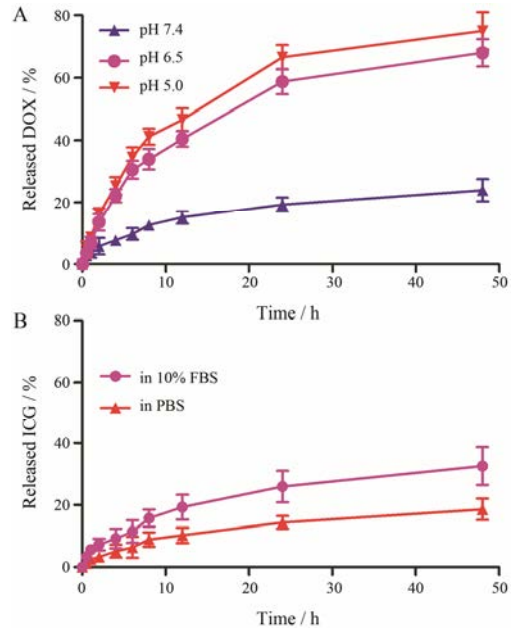
### 4 体外释放实验

采用透析袋法对 LH-DOX/ICG 胶束的体外释放行为进行考察<sup>[13]</sup>。当 pH 为 7.4 时, DOX 很难从胶束中释放, 48 h 时释放度仅为  $(24.6 \pm 3.60)\%$ ; 当 pH 为 6.5 和 5.0 时, 释放明显增加, 分别达到  $(68.3 \pm 4.43)\%$  和  $(75.6 \pm 6.03)\%$  (图 4A)。结果表明, 该胶束在 pH 5.0~6.5 偏酸性条件下, LH-DOX/ICG 胶束中的 DOX 更容易释放。为了模拟体内环境, 本课题使用含 10% FBS 的 PBS 作为释放介质 (图 4B), 48 h 时, ICG 在 10% FBS 中的释放率小于 35%, 在 PBS 中的释放率小于 20%, 表明 LH-DOX/ICG 胶束对 ICG 较好的保

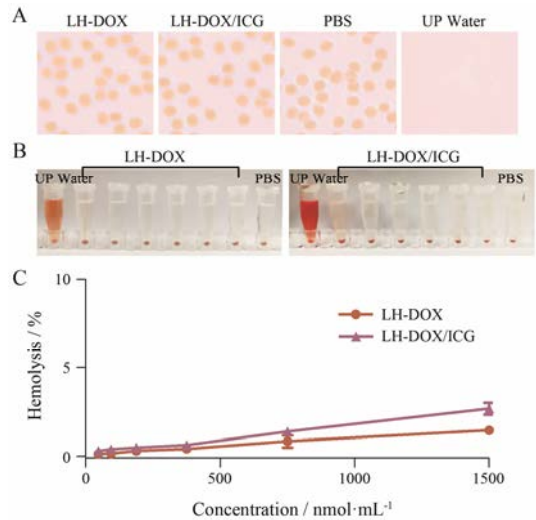
护作用。

### 5 溶血性实验

在显微镜下可见, 红细胞与不同浓度 LH-DOX 和 LH-DOX/ICG 胶束溶液孵育后, 形态仍保持正常, 与 PBS 组并无明显差异 (图 5A); 由左至右两种胶束的浓度从高到低, 各浓度下的胶束均未引起红细



**Figure 4** The release profiles of LH-DOX/ICG *in vitro*. A: The DOX release profiles of LH-DOX/ICG at different pH; B: The ICG release profiles of LH-DOX/ICG at different medium.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$



**Figure 5** The safety evaluation of different micelles. A: Microscopic images of red blood cells exposed to different micelles; B: Photo images of tubes containing supernatant from red blood cells exposed to LH-DOX and LH-DOX/ICG at varying concentrations. PBS and UP water were used as negative and positive controls, respectively. C: Graphical representation of percent hemolysis by different micelles.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$

胞破裂 (图 5B); LH-DOX 和 LH-DOX/ICG 胶束的溶血率均小于 5% (图 5C)。以上结果显示浓度范围在 46.875~1 500 nmol·mL<sup>-1</sup> LH-DOX 和 LH-DOX/ICG 胶束均不会引起红细胞溶血, 表明胶束具有良好的生物相容性。

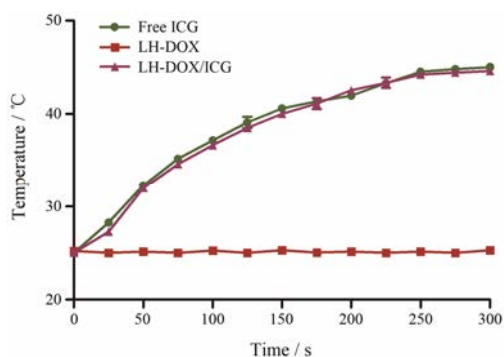
### 6 体外光热效应

据文献<sup>[14, 15]</sup>报道, ICG 质量浓度大于 2 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 能够触发高热效应, 43 °C 以上的高温即会对肿瘤细胞的细胞骨架和细胞膜产生不可逆损伤。如图 6 结果显示, LH-DOX/ICG 胶束组与游离 ICG 组均能在激光照射下发生光热转换, 触发高热效应, 在照射时间达到 300 s 时, 溶液温度升高至 45 °C, 两组之间无明显差异, 表明物理包载过程对 ICG 的光热性能并无影响。而 LH-DOX 组由于不含 ICG, 不能引起光热转换使溶液温度升高。

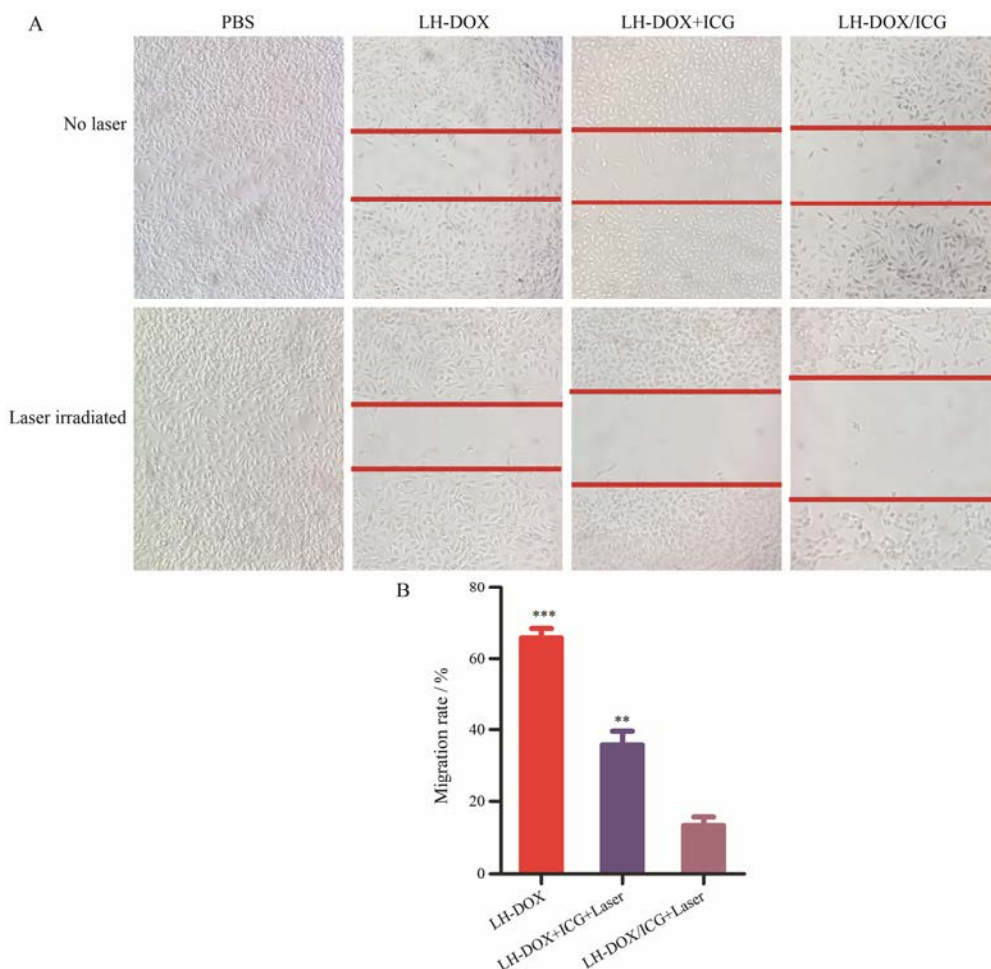
### 7 划痕愈合实验

细胞迁移运动在肿瘤转移中扮演重要角色, 因此

采用划痕愈合实验考察 LH-DOX/ICG 胶束对 B16F10 细胞迁移运动与修复能力的影响<sup>[16]</sup>。对照组在划痕后 12 h, B16F10 细胞通过迁移填满划痕区域; 当加入 LH-DOX、LH-DOX+ICG 和 LH-DOX/ICG 后, 划痕区域的愈合情况明显受到抑制而减慢; 由图 7 可见, 在给予激光照射后, LH-DOX+ICG 和 LH-DOX/ICG 组



**Figure 6** The photo-thermal effect of different formulations. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$



**Figure 7** Effect of B16F10 cells scratch metastasis by different formulations. A: The macroscopic scratch healing images of different formulations; B: The migration rate of different formulations. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* *P* < 0.01, \*\*\* *P* < 0.001 vs LH-DOX/ICG group with laser irradiation

的迁移率显著地低于 LH-DOX 组, 表明在激光照射后 ICG 能够发挥抑制肿瘤迁移的作用。LH-DOX+ICG 和 LH-DOX/ICG 组的迁移率分别为  $(35.92 \pm 3.67)\%$  和  $(13.23 \pm 2.42)\%$ , 两者间有显著性差异, 导致这一现象的原因: LH-DOX+ICG 组中的 ICG 为游离状态, 稳定性较差, 在进入细胞的过程中部分被破坏; 而 LH-DOX/ICG 组中, 胶束将 ICG 包载于内核, 起到保护作用, 故 LH-DOX/ICG 能在激光照射下更好地发挥抑制肿瘤细胞迁移运动与修复能力。

## 8 细胞毒性实验

采用 MTT 法考察胶束对 B16F10 细胞的毒性。图 8A 所示, 游离 DOX 和 LH-DOX 胶束对 B16F10 细胞都有一定程度的毒性, 并且杀伤作用与 DOX 呈剂量依赖关系; 在相同的 DOX 浓度下, LH-DOX 胶束的毒性要低于游离的 DOX。图 8B 所示, 在无激光照射时, LH-DOX、LH-DOX+ICG 和 LH-DOX/ICG 对 B16F10 细胞都有一定程度的毒性, 并且杀伤作用与 DOX 呈剂量依赖关系, 但三者之间并没有显著性差异。当给予激光照射后, LH-DOX+ICG 和 LH-DOX/ICG 组的细胞存活率进一步降低, 但 LH-DOX/ICG

组的存活率仍低于 LH-DOX+ICG 组, 且有显著性差异, 原因是游离的 ICG 不稳定, 而 LH-DOX/ICG 胶束将 ICG 包载于疏水核心, 保护 ICG 不被降解, 故 LH-DOX/ICG 能在激光照射下更好地抑制肿瘤细胞生长。

## 9 细胞凋亡实验

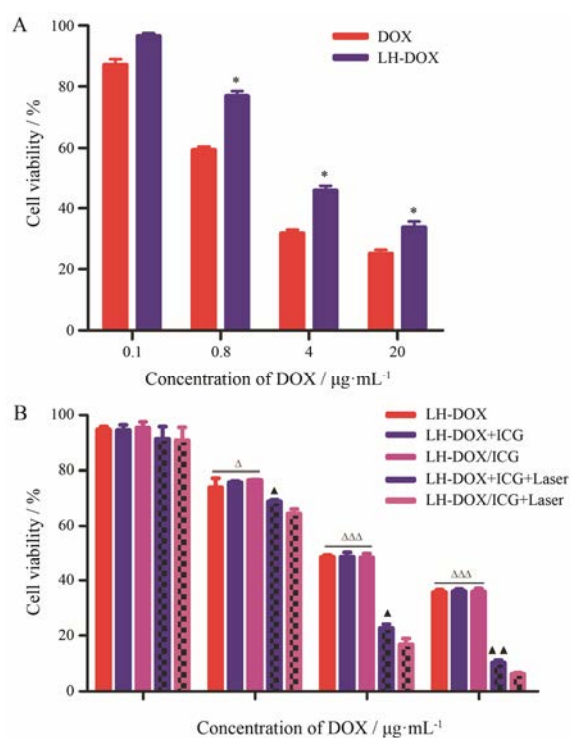
采用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒和 Calcein-AM/PI 双染试剂盒考察各组胶束诱导 B16F10 细胞凋亡的能力<sup>[17]</sup>。正常细胞 Annexin V-FITC 和 PI 染色均为阴性, 早期凋亡阶段的细胞 Annexin V-FITC 阳性而 PI 阴性, 晚期凋亡阶段和坏死的细胞 Annexin V-FITC 和 PI 均为阳性。由图 9A 可见, 配合激光照射的 LH-DOX/ICG 组诱导细胞凋亡和坏死的数量显著高于 LH-DOX 组和未给予激光照射的 LH-DOX/ICG 组; Calcein-AM 标记活细胞, PI 标记死细胞, 图 9B 显示出与图 9A 相同的结果, 应注意到的是, 在激光照射下, LH-DOX/ICG 组的凋亡细胞数量高于 LH-DOX+ICG 组, 其原因与 ICG 的稳定性有关, LH-DOX/ICG 组中的 ICG 由于被胶束包载保护, 其稳定性高于 LH-DOX+ICG 组中游离的 ICG, 故在激光照射下 LH-DOX/ICG 胶束能够更好地对 B16F10 细胞进行有效的化疗及光热协同治疗。

## 讨论

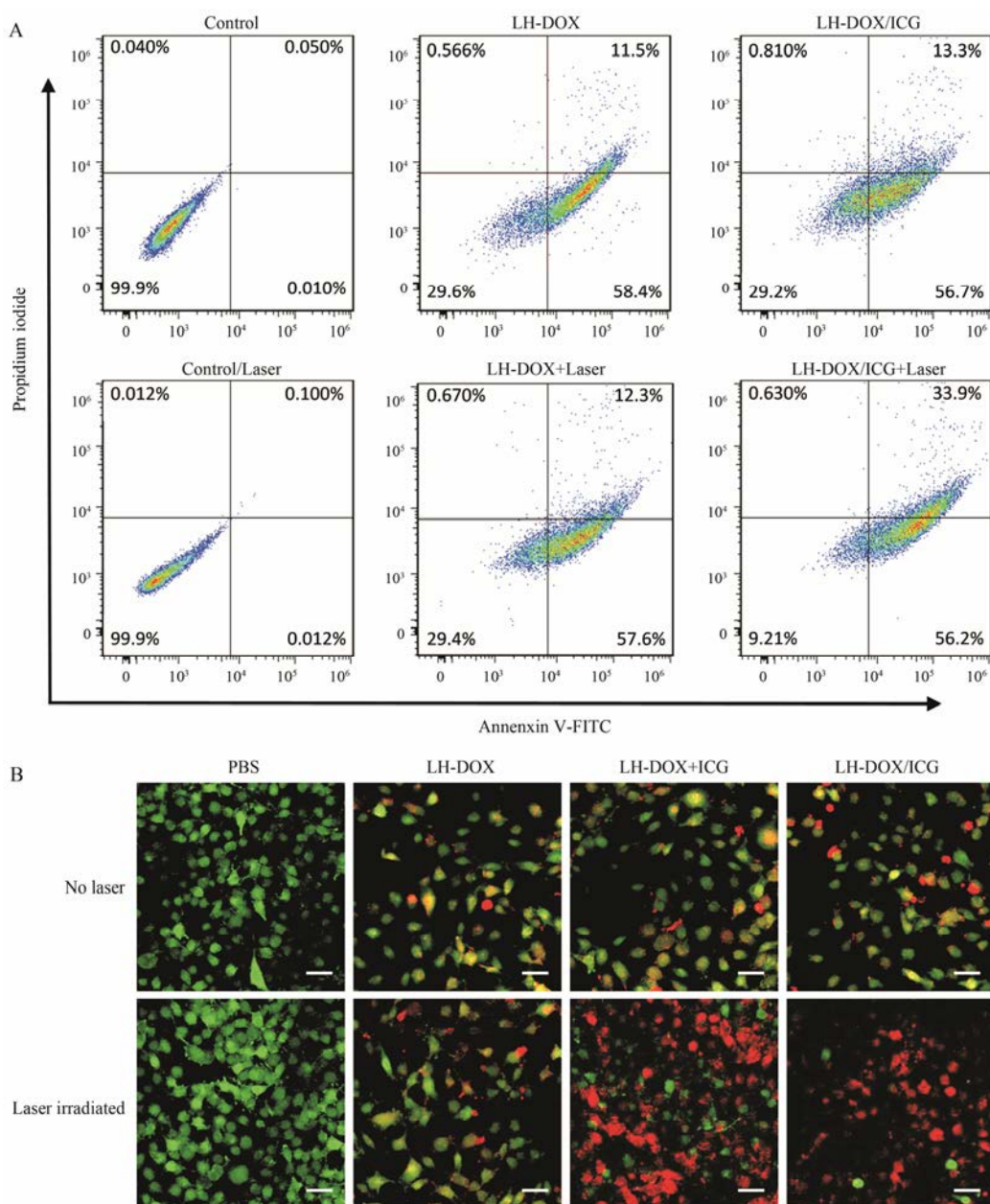
本课题构建的两亲性聚合物胶束 LH-DOX/ICG, 在生理等渗透缓冲液中自组装形成大小均一, 形态规则的一类球形纳米级别胶束。研究表明, 粒径在 100~200 nm 内的纳米粒能通过实体瘤的高通透性和 EPR 效应被动靶向到肿瘤部位<sup>[18]</sup>。本课题构建的 LH-DOX/ICG 粒径为  $(148.7 \pm 2.1)$  nm, 呈负电荷, 满足了被动靶向的基本条件。

为了验证该聚合物胶束的 pH 响应性, 考察了不同 pH 下 LH-DOX/ICG 中 DOX 的释放行为。结果表明, 当缓冲介质的 pH 从 7.4 下降至 6.5 时, 在相同孵育时间下 DOX 的释放明显增加。这说明该胶束中连接两亲性片段的脲键在环境 pH 下降后, 能成功断裂并释放 DOX。此外, 还考察了 ICG 的释放行为, 其在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中释放缓慢, 无突释情况出现; 在模拟体内循环环境的 10% FBS 介质中, ICG 的释放稍快。

热疗对细胞的杀伤作用存在临界温度, 通常肿瘤细胞的临界温度在  $42.5 \sim 43$  °C, 极少数细胞可达  $44$  °C<sup>[19]</sup>。ICG 作为一种光热剂, 一般以游离形式给



**Figure 8** *In vitro* cytotoxicity assay of different DOX formulations on B16F10 cells. A: The cytotoxicity study of free DOX and LH-DOX micelles; B: The cytotoxicity study of LH-DOX, LH-DOX+ICG and LH-DOX/ICG with or without laser irradiated.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs DOX group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$  vs LH-DOX+ICG+laser group;  $\blacktriangle P < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs LH-DOX/ICG+laser group



**Figure 9** Cell survivals of B16F10 cells after chemo-photothermal treatment. A: Flow cytometry analysis of B16F10 cells after chemo-photothermal treatment. B: Confocal images of B16F10 cells after chemo-photothermal treatment. Viable cells were stained green with calcein-AM, and dead/late apoptosis cells were stained red with PI (scale bar, 35 μm)

药。将 ICG 包载在胶束中，对其光热效应进行了考察。结果表明，胶束具有优异的光热转化能力，ICG 在以物理包载的方式载入 LH-DOX/ICG 胶束后并不影响其光热转化能力。

据文献<sup>[10]</sup>报道，疏水片段 LH 具有抗转移功能。划痕愈合实验表明，LH-DOX/ICG 胶束在配合激光照射下，迁移率最低，表明化疗-光热治疗发挥协同作用，提高抗迁移效果。

为了验证 LH-DOX/ICG 胶束对肿瘤细胞的杀伤作用，考察了 LH-DOX/ICG 胶束对 B16F10 细胞

的细胞毒性。当给予 LH-DOX/ICG 组激光照射后，发现 B16F10 细胞存活率明显下降，与未照射组和 LH-DOX+ICG 组相比呈显著性差异，达到联合化疗和光热治疗作用，提高了抗肿瘤的效果。而这一效果在对 B16F10 细胞的凋亡诱导实验中也得到了证实。当 LH-DOX/ICG 组配合激光照射后，可以发现 B16F10 细胞凋亡和坏死数量明显上升，与 LH-DOX+ICG 组相比呈显著性差异，这是因为 LH-DOX/ICG 组的 ICG 包载于胶束疏水内核，较好地保护了 ICG 不被降解，故 LH-DOX/ICG 胶束能更好地发挥光热转化作用。由此

可见, LH-DOX/ICG 胶束对细胞的化疗-光热治疗具有协同作用, 可增强细胞杀伤能力, 提高疗效。

本课题制备了共载化疗药物 DOX 和光热剂 ICG 的 LH-DOX/ICG 胶束, 联合化疗和光热治疗, 发挥了对黑色素瘤细胞的抗肿瘤和抗转移作用。后续工作将进一步探索该制剂在动物体内的药效学以及药代动力学, 为临床研究提供更多的理论依据。

## References

- [1] Chen YW, Su YL, Hu SH, et al. Functionalized graphene nanocomposites for enhancing photothermal therapy in tumor treatment [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2016, 105: 190–204.
- [2] Zheng M, Yue C, Ma Y, et al. Single-step assembly of DOX/ICG loaded lipid-polymer nanoparticles for highly effective chemo-photothermal combination therapy [J]. *ACS Nano*, 2013, 7: 2056–2067.
- [3] Tang Y, McGoron AJ. Combined effects of laser-ICG photothermotherapy and doxorubicin chemotherapy on ovarian cancer cells [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2009, 97: 138–144.
- [4] Zhao P, Zheng M, Yue C, et al. Improving drug accumulation and photothermal efficacy in tumor depending on size of ICG loaded lipid-polymer nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 6037–6046.
- [5] Li JZ, Yuan ZQ, Yan M, et al. pH-Sensitive micelles loaded paclitaxel using carboxymethyl chitosan-palmitic acid mediated by cRGD [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 642–649.
- [6] Chalkiadaki G, Nikitovic D, Katonis P, et al. Low molecular weight heparin inhibits melanoma cell adhesion and migration through a PKCa/JNK signaling pathway inducing actin cytoskeleton changes [J]. *Cancer Lett*, 2011, 312: 235–244.
- [7] Young E, Venner T, Ribau J, et al. The binding of unfractionated heparin and low molecular weight heparin to thrombin-activated human endothelial cells [J]. *Thromb Res*, 1999, 96: 373–381.
- [8] Norrby K. Low-molecular-weight heparins and angiogenesis [J]. *APMIS*, 2006, 114: 79–102.
- [9] Yin XL, Zhang B, Liu YJ, et al. Advances in polymer-drug conjugated micelles in the delivery of anticancer drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 710–716.
- [10] Mei L, Liu Y, Xia C, et al. Polymer-drug nanoparticles combine doxorubicin carrier and heparin bioactivity functionalities for primary and metastatic cancer treatment [J]. *Mol Pharm*, 2017, 14: 513–522.
- [11] Zhang HW. Co-delivery of Indocyanine Green and Doxorubicin from Chitosan-based Micelle System and Their Use in Near-infrared Photothermal-Chemotherapy (壳聚糖基复合胶束体系用于共负载吲哚菁绿与阿霉素的肿瘤光热化疗的研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [12] Patel PM, Patel R, Wadia D, et al. Dendritic macromolecules as nano-scale drug carriers: phase solubility, *in vitro* drug release, hemolysis and cytotoxicity study [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2015, 10: 306–313.
- [13] Manchun S, Dass CR, Sriamornsak P. Stability of freeze-dried pH-responsive dextrin nanogels containing doxorubicin [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2016, 11: 648–654.
- [14] Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2002, 3: 487–497.
- [15] Hung CC, Huang WC, Lin YW, et al. Active tumor permeation and uptake of surface charge-switchable theranostic nanoparticles for imaging-guided photothermal/chemo combinatorial therapy [J]. *Theranostics*, 2016, 6: 302.
- [16] Veiseh O, Kievit FM, Ellenbogen RG, et al. Cancer cell invasion: treatment and monitoring opportunities in nanomedicine [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2011, 63: 582–596.
- [17] Chen Y, Li H, Deng Y, et al. Near-infrared light triggered drug delivery system for higher efficacy of combined chemophotothermal treatment [J]. *Acta Biomaterial*, 2017, 51: 374–392.
- [18] Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging *in vivo* [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2013, 65: 71–79.
- [19] Frazier N, Robinson R, Ray A, et al. Effects of heating temperature and duration by gold nanorod mediated plasmonic photothermal therapy on copolymer accumulation in tumor tissue [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12: 1605–1614.