

淫羊藿素与焦脱镁叶绿酸-a 自组装纳米药物通过诱导细胞自噬促进肿瘤光动力疗效的研究

关润钿¹, 郑蓉蓉¹, 杨妮², 饶小娜¹, 李仕颖^{1*}

(1. 广州医科大学药学院, 广东 广州 511436; 2. 广东药科大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 自噬 (autophagy) 经常发生在细胞遭受氧化应激 (oxidative stress) 后, 通过吞噬受损结构并降解成营养物质, 从而降低氧化损伤, 促进癌细胞存活并降低光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 的治疗效果。然而过度激活自噬能促进细胞发生凋亡, 本研究使用光敏剂焦脱镁叶绿酸-a (pyropheophorbide-a, Ppa) 产生大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 达到杀伤癌细胞的效果, 同时通过联用自噬诱导剂淫羊藿素 (icaritin, Ica) 过度激活自噬, 使其对癌细胞的保护转变为促进癌细胞凋亡的作用, 进而达到提高 PDT 的效果。本研究利用 Ica 与 Ppa 间的相互作用力, 成功构建了具有稳定性好、载药量高等特点的自组装纳米药物 IP。其中, 该纳米药物合成方法简单, 通过药物自身作为载体, 将 Ica 与 Ppa 的载药量 (loading capacity, LA) 分别提升至 83.53% 和 16.45%, 且不引入纳米载体潜在的生物安全性隐患。与游离 Ppa 相比, 自组装纳米药物 IP 在细胞摄取和 ROS 产生等方面展现出优越性能。此外, 自组装纳米药物 IP 能通过激活肿瘤细胞发生自噬, 进而逆转 PDT 诱发的保护性自噬并促进细胞凋亡和抗肿瘤协同, 显著提高 PDT 的抗肿瘤活性。

关键词: 光动力治疗; 自噬; 自组装; 纳米药物; 癌症

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2483-11

Icaritin and pyropheophorbide-a self-assembled nanomedicine for enhanced the efficacy of photodynamic tumor therapy by increase the cell autophagy

GUAN Run-tian¹, ZHENG Rong-rong¹, YANG Ni², RAO Xiao-na¹, LI Shi-ying^{1*}

(1. School of Pharmacy, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China; 2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Autophagy often occurs after cells are attacked by oxidative stress, where damaged structures are phagocytic and degraded into nutrients, thereby reducing oxidative damage, promoting the survival of cancer cells and reducing the therapeutic effect of photodynamic therapy (PDT). However, excessive activation of autophagy can promote cell apoptosis. In this paper, the photosensitizer pyropheophorbide-a (Ppa) was used to produce a large amount of reactive oxygen species (ROS) to achieve the effect of killing cancer cells. At the same time, icaritin (Ica), an autophagy inducer, was used to over-activate autophagy, which transformed the protection of cancer cells into the promotion of cancer cell apoptosis, so as to improve the effect of photodynamic therapy. In this study, the interaction force between Ica and Ppa was exploited to successfully construct a self-assembled nanomedicine IP with good stability and high drug load. The synthesis method is simple, through using the drug itself as a carrier, and the loading capacity (LA) of Ica and Ppa can be increased to 83.53% and 16.45% without introducing potential

收稿日期: 2022-08-18; 修回日期: 2022-09-06.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1800600); 广东省基础与应用基础研究项目 (2021B1515020043).

*通讯作者 Tel: 86-20-37103274, E-mail: lisy-sci@gzhu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0997

biosafety risks of nanocarriers. Compared with free Ppa, self-assembled nanomedicine IP showed superior performance in cellular uptake and reactive oxygen species production. In addition, the self-assembled nanomedicine IP can reverse the protective autophagy induced by PDT by activating the autophagy of tumor cells, and facilitate apoptosis and antitumor coordination, which significantly improves the antitumor activity of PDT.

Key words: photodynamic therapy; autophagy; self-assembly; nanomedicine; cancer

光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 作为广泛应用的抗肿瘤治疗手段, 由于其高效性、非侵入性、无耐药性等优势, 是近年来研究的热点^[1]。在光照条件下, 摄取进入癌细胞的光敏剂能把细胞内 O₂ 转化为具有强氧化活性和细胞毒性的活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 从而氧化细胞内蛋白、脂质和 DNA, 达到抑制细胞增殖和抗肿瘤的目的^[2]。

自噬 (autophagy) 是一种细胞内重要的物质分解过程, 通过把细胞内受损的细胞器或细胞质包裹后形成自噬体, 并递送到溶酶体中降解成可重新利用的营养物质^[3]。PDT 过程中产生的 ROS 可诱发肿瘤细胞自噬行为, 通过吞噬损伤的细胞部位并降解为基础营养物质以继续存活, 从而降低 PDT 带来的细胞毒性^[4]。自噬的发生依赖于一些相关蛋白进行调控, 而这些蛋白也可作为自噬发生的标志^[5]。在自噬体延伸过程中, 自噬相关蛋白 5 (autophagy related protein 5, ATG5) 是必不可少的^[6]。ATG5 复合物定位在自噬体的膜上后, 膜向着背对 ATG5 的方向发生弯曲和延伸^[7]。ATG5 复合物与自噬体膜的结合后, 还会募集微管相关蛋白 1 轻链 3 β (microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta, LC3B)^[8]。在自噬过程中, LC3B 最后会从 LC3B-I 脂质化成 LC3B-II, LC3B-II 的表达与自噬的发生呈正相关^[9]。受损的胞质经自噬体递送到溶酶体并降解成对细胞有益的营养物质^[10], 起到促进癌细胞的作用。然而自噬也是一把双刃剑, 过度激活的自噬会导致细胞死亡^[11,12]。研究表明^[13], 尽管 PDT 过程中产生的 ROS 激活促进癌细胞存活的自噬, 但使用自噬诱导剂能将 PDT 中自噬的促存活作用逆转成促凋亡。

据文献^[14]报道, 淫羊藿素 (icaritin, Ica) 是从淫羊藿中提取的一种异戊二烯类黄酮衍生物, 对多种癌症都有治疗效果。Ica 能通过诱导线粒体发生自噬, 使肝癌细胞发生凋亡^[15]。而焦脱镁叶绿酸-a (pyropheophorbide-a, Ppa) 是一种常用的光敏剂, 具有较强的 PDT 效果, 目前已有大量相关研究^[16]。但这两种药物较差的水溶性限制了细胞摄取, 通过构建纳米药物递送载体能有效提升其摄取能力。其中, 在 PDT 中, 光敏剂一般通过制备成纳米药物实现细胞递送^[17], 如使用脂质体包载后递送^[18], 或使用多肽修饰后进行

递送^[19]。然而, 它们的设计和合成复杂, 且载药量较低, 在实际条件中难以实现广泛应用。最近, 一种可实现药物与药物间自组装的自递送系统得以被设计, 其通过药物与药物间的分子间相互作用力自组装形成纳米药物, 具有良好的药物稳定性和较高的载药量, 且具有无需载体或其他物质进行修饰, 合成过程简单等优势^[20]。然而, 基于光敏剂和自噬调节剂的自传递纳米药物未见相关报道。

本研究将自噬诱导剂 Ica 与光敏剂 Ppa 通过分子间相互作用力自组装形成纳米药物, 构建了一种自递送的纳米药物 (简称 IP)。由于药物自身作为载体, 纳米药物 IP 具有较高的载药量, 形成的纳米药物改善了单一药物的疏水性, 能在水相中表现出良好的稳定性, 并且增强了药物在细胞中的摄取。在光照条件下, 纳米药物 IP 中的光敏剂生成的活性氧可引发细胞凋亡, 自噬诱导剂 Ica 可进一步诱导肿瘤细胞过度自噬, 不仅可促凋亡, 还能逆转 PDT 中自噬的抗凋亡作用, 进而促进 PDT 效果。

材料与方法

主要仪器 纳米颗粒分析仪 (MAL1175005, 英国马尔文仪器有限公司); 透射电子显微镜 (JEM-1400 PLUS, 捷欧路科贸有限公司); 紫外分光光度计 (UV-2600)、荧光分光光度计 (RF-5301PC)、高效液相色谱仪 (LC-20AT) (岛津仪器设备有限公司); 超高分辨率共聚焦显微镜 (LSM 880, 德国卡尔蔡司有限公司); Amnis 成像流式细胞仪 (德国默克密理博公司); 630 nm LED 光源 (北京镭源科技有限公司); 精密电子天平 (SQP, 赛多利斯科学仪器有限公司)。

主要试剂 Ica、Ppa (上海源叶生物科技有限公司); DCFH-DA (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate)、Hoechst 33342、Rhodamine 123、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 单线态氧绿色荧光探针 (singlet oxygen sensor green, SOSG, 大连美仑生物技术有限公司); CellROX™ Green 试剂 (美国英杰生命技术有限公司); 洗膜缓冲液 TBST (Tris buffered saline

Tween) 粉末 (广州晶欣生物科技有限公司); RIPA (radio immunoprecipitation assay) 裂解和提取缓冲液、BCA (bicinchoninic acid) 试剂盒 (赛默飞世尔科技公司); 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (默克公司); 蛋白酶抑制剂、LC3B 抗体、ATG5 (D5F5U) rabbit mAb (Cell Signaling 公司); 辣根酶标记抗兔 IgG、辣根酶标记抗鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); 所有细胞培养相关试剂如磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS)、高糖 DMEM、胎牛血清 (FBS)、青霉素-链霉素 (penicillin-streptomycin solution, PS) 混合液 [赛默飞世尔生物化学制品 (北京) 有限公司]。

纳米药物 IP 的制备 分别将 Ica 和 Ppa 溶解成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DMSO 溶液, Ica 和 Ppa 的 DMSO 溶液按照摩尔比为 3:1 ($108 \mu\text{L}:53 \mu\text{L}$) 的投料比在 EP 管中混匀后, 在超声中滴入到 2 mL 的超纯水中, 用移液枪吹打 50 次后, 继续超声 15 min。收集超声后的溶液并用 $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 30 min, 以除去溶液中的游离 Ica 和 Ppa。离心去除上清液后加入 2 mL 的超纯水进行重悬, 得到纳米药物 IP。再以此方法分别制备 Ica 和 Ppa 的投料比为 1:1 ($36 \mu\text{L}:53 \mu\text{L}$)、2:1 ($72 \mu\text{L}:53 \mu\text{L}$) 的纳米药物。

纳米药物 IP 的表征 采用超纯水把不同投料比的纳米药物稀释 3 倍, 在超声中使用移液枪吹打 30 下后得到纳米药物的稀释水溶液。使用动态光散射法 (dynamic light scattering, DLS) 连续 7 天测量各比例纳米药物的粒径大小及多分散系数 (polydispersity index, PDI), 并测量纳米药物的 zeta 电势。将纳米药物适当稀释后, 分别滴加在 300 目的普通碳支持膜正面上以制备电镜样品。样品自然阴干后通过透射电子显微镜观察纳米药物的微观形态。

纳米药物 IP 的载药量 首先根据纳米药物 IP 的投料量分别制备 Ica 和 Ppa 的标准溶液, 并使用高效液相色谱仪制作药物的标准曲线。在纳米药物 IP 的合成中, Ica 的投料浓度为 $0.54 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 由于提纯后药物的量会有所损耗, 所以样品在稀释 10 倍后 Ica 会少于 $54 \mu\text{g}$ 。故 Ica 标准溶液的浓度设置为 10、15、20、25、30、40、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。同样地, Ppa 的投料浓度为 $0.265 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 故 Ppa 标准溶液的浓度设置为 2、5、10、15、20、25、30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。合成纳米药物 IP 的平行样品 3 个, 使用 DMSO 稀释 10 倍后加入到色谱瓶中, 超声 1 min, 使用高效液相色谱仪测定峰面积, 其中紫外可见吸收检测器作为检测器。色谱条件如下: 流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸水溶液; 流动相 B 为乙腈。使用二元高压梯度洗脱, 保留时间与流动相比例为: 0~9 min,

A:B (40~60); 9~30 min, A:B (5~95); 30~45 min, A:B (0~100)。经过计算后得出纳米药物 IP 中的载药量 (loading capacity, LA) 和包封率 (entrapment efficiency, EE)。载药率和包封率的计算公式分别如公式 (1、2)。

$$LA = \frac{W_{\text{IP中药物的质量}}}{W_{\text{IP的质量}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$EE = \frac{W_{\text{IP中的载药量}}}{W_{\text{投药量}}} \times 100\% \quad (2)$$

纳米药物 IP 自组装机制的探索 将 25 μL 纳米药物 IP 分别加入到 975 μL HCl 水溶液和 NaOH 水溶液中 (HCl 水溶液和 NaOH 水溶液的 pH 分别为 3 和 12), 测量其紫外-可见吸收光谱。配制不同摩尔浓度 (0、0.25、0.5、1、1.5、2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 NaCl 水溶液, 将 25 μL 纳米药物 IP 分别加入到 975 μL 不同浓度的 NaCl 水溶液中, 测量其紫外-可见吸收光谱。观察随着 NaCl 浓度的升高, Ppa 在 660 nm 的最大吸收峰的变化。将 20 mg 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 加入到 10 mL 超纯水中, 混匀并超声, 得到 0.2% SDS 溶液。以超纯水做基线, 测量 0.2% SDS 溶液的紫外-可见吸收光谱。将 25 μL 纳米药物 IP 分别加入到 975 μL 的超纯水和 0.2% 的 SDS 溶液中, 观察在 660 nm 处的最大吸收峰的变化。将 Ppa 配成 $32.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水溶液, 测量其紫外可见分光光谱, 与纳米药物 IP 的水溶液比较在 660 nm 处的最大吸收峰的变化。

细胞培养 小鼠乳腺癌细胞 (4T1 细胞, 购自美国菌种保藏中心), 加入到含 10% FBS 和 1% PS 的 DMEM 的细胞培养基中, 并放于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中。

纳米药物 IP 在 4T1 中的摄取 使用共聚焦小皿 (广州晶欣生物科技有限公司) 培养 4T1 细胞, 分别加入 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ppa、等浓度的纳米药物 IP 到细胞中孵育, 全程保持避光条件。孵育时间逐渐递增, 在 6、12、18 h 后弃去原有培养基, 用 PBS 清洗 3 次, 再使用 Hoechst 33342 染料染细胞核, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 20 min 后用 PBS 清洗 3 次后。使用共聚焦显微镜观察 4T1 细胞中随摄取时间逐渐增加后 Ppa 产生的红色荧光强度的变化。保持孵育时间为 12 h, Ppa 和纳米药物 IP 的浓度逐渐增加, 分别为 2、5、8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。经 Hoechst 33342 处理后, 使用共聚焦显微镜观察随着药物浓度逐渐增加后的 Ppa 产生的红色荧光强度的变化。

使用 Amnis 成像流式细胞仪对摄取进入 4T1 细胞的纳米药物 IP 进行定量。使用 6 孔板培养 4T1 细胞, 在不同孔中分别加入 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ppa 和等浓度的纳米药物 IP 并在避光条件下孵育。分别于 6、12、18 h 后, 弃去原有培养基, 用 PBS 清洗 3 次, 再用胰酶消化细胞

3 min 后用 DMEM 停止消化并把细胞收集在 EP 管中。离心 ($3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\ ^\circ\text{C}$) 后使用 1 mL PBS 清洗, 再次离心后使用 200 μL PBS 重悬, 使用流式细胞仪检测增加摄取时间后在 4T1 细胞中 Ppa 产生的红色荧光强度的变化。加入到 4T1 的 Ppa 和纳米药物 IP 的浓度逐渐增加 ($2.5, 8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。处理后使用流式细胞仪检测随着药物浓度的增加, 摄取进入 4T1 细胞的药物中 Ppa 产生的红色荧光强度的变化。

纳米药物 IP 产生的单线态氧 使用 SOSG 为单线态氧的检测试剂, 在荧光分光光度计检测纳米药物在水溶液中单线态氧的生成。根据定量, 以 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ppa 为标准, 把各组药物 [IP (+)、IP、Ppa (+)、Ppa、Ica] 配成等量的 1 mL 的水溶液。其中, IP (+)、IP、Ppa (+)、Ppa、Ica 分别为纳米药物 IP 加光照、纳米药物 IP 无光照、单纯的 Ppa 加光照、单纯的 Ppa 无光照、单纯的 Ica 无光照。将 SOSG 探针配成 $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲醇溶液, 取 10 μL SOSG 甲醇溶液与 990 μL 的各组药物混合, 成为检测溶液。光照组 [IP (+)、Ppa (+)] 使用 He-Ne 激光 (激光强度: $50\ \text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) 照射检测溶液 20 s, 并马上放入到荧光分光光度计中进行测量。其余组在黑暗中孵育相同时间后测量荧光。使用 488 nm 激发波长对溶液荧光进行检测, 以光照射 PBS 中 SOSG ($5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 为空白对照 (10 μL SOSG 溶液加入到 990 μL PBS)。

纳米药物 IP 在 4T1 产生的 ROS 使用共聚焦小皿培养 4T1 细胞 24 h, 并根据定量加入以 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ppa 为标准的各组别药物 [IP (+)、IP、Ppa (+)、Ppa、Ica、Ppa + Ica、Ppa + Ica (+)], 孵育 12 h。使用 PBS 洗涤细胞, 并与 DCFH-DA 一起孵育 30 min 后使用 PBS 洗涤细胞。对于无光照处理组 (IP、Ppa、Ica、Ppa + Ica), 洗涤后直接拍摄; 而对于光照组 [IP (+)、Ppa (+)、Ppa + Ica (+)], 细胞暴露于光下 1 min 后进行拍摄。加药组与空白组比较荧光强度。使用 CellROX™ Green 探针处理的步骤与此相同。

纳米药物 IP 在 4T1 诱导自噬 使用共聚焦小皿培养 4T1 细胞 24 h, 分别加入 $10, 20, 40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Ica 处理细胞, 孵育 12 h 后用 PBS 洗 3 次, 并使用 Rhodamine 123 孵育 30 min 并用 PBS 洗涤后, 使用共聚焦观察 4T1 细胞中加入 Ica 后发生自噬的变化。使用蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 检测自噬相关蛋白的表达。在 6 孔板培养 4T1 细胞 24 h 后, 根据定量加入以 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ppa 为标准的各组药物 [IP (+)、IP、Ppa (+)、Ppa、Ica、Ppa + Ica、Ppa + Ica (+)] 处理细胞后, 光照 30 s, 继续孵育 4 h。经过 PBS 清洗细胞后, 在冰上利用 RIPA 裂解、提取缓冲液和蛋白酶抑制剂裂解细胞, 提取细胞总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度, 并加入 RIPA 和

SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液将各样品稀释成相同浓度, 在沸水中煮 10 min 后进行 SDS-PAGE 电泳, 使用半干法转 PVDF 膜, 恒流 300 mV 保持 2 h。使用 5% 脱脂奶粉封闭 90 min, $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜孵育一抗 [LC3B 抗体、ATG5 (D5F5U) rabbit mAb]; 使用 TBST 将洗膜 5 次, 室温孵育相应的荧光二抗 2 h, 最后使用曝光显色。使用 Image J 软件扫描蛋白条带并定量分析。

纳米药物 IP 对 4T1 的体外毒性实验 首先通过 MTT 法评估纳米药物 IP 对 4T1 的 PDT 效果。使用 96 孔板培养 4T1 细胞, Ppa、Ica 和纳米药物 IP 以 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ppa 为最高浓度标准向下梯度稀释, 配好的稀释药物分别加 100 μL 至 96 孔板中。每列留 1 个孔为空白对照组, 只加培养基。避光孵育 12 h 后, 光照组 [IP (+)、Ppa (+)、Ppa + Ica (+)] 在 LED 照明灯下光照 10 s 后继续孵育 12 h。无光照处理组 (IP、Ppa、Ica、Ppa + Ica) 避光孵育 24 h。然后, 每孔加入 20 μL MTT ($5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 继续避光孵育 4 h, 吸走上清液后, 每孔加入 150 μL DMSO, 并使用酶标仪检测 570 nm 处吸光度, 并计算细胞存活率。

使用流式细胞仪评估纳米药物 IP 对 4T1 的 PDT 效果。6 孔板经 4T1 细胞种板后培养 24 h, 经过 Ppa、Ica、Ppa + Ica 和 IP 分别处理后避光孵育 12 h, 光照组 [IP (+)、Ppa (+)、Ppa + Ica (+)] 细胞暴露于 LED 灯下 30 s。所有组别用 PBS 洗 3 次后, 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 孵育 2 min, 收集细胞到 EP 管中。离心 ($3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 3 min) 后弃上清, 沉淀用 1 mL PBS 重悬清洗, 转移至 1.5 mL EP 管中。再次离心后吸去上清, 加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液重悬, 再加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙啶染色液混匀。于 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 20 min 后使用流式细胞仪进行检测。Ppa、Ica 和 IP 加药浓度以定量后纳米药物 IP 中含 $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ppa 时的浓度为准。

对于活/死细胞染色实验, 聚焦小皿经 4T1 细胞种板后培养 24 h, 经过 Ppa、Ica、Ppa + Ica 和纳米药物 IP 分别处理后孵育 6 h, 用 PBS 洗 3 次后, 光照组 [IP (+)、Ppa (+)、Ppa + Ica (+)] 细胞暴露于 LED 灯下 3 min, 使用活/死细胞染料 (1 mL 培养基加 0.5 μL 钙黄绿素、1.5 μL 碘化丙啶) 染色孵育 20 min。通过共聚焦观察各组别细胞中活细胞 (488 nm 处的绿色荧光) 和死细胞 (535 nm 处的红色荧光) 间的比例。Ppa、Ica 和 IP 组加药浓度以定量后纳米药物 IP 中含 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ppa 时的浓度为准。

统计学分析 用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Student's *t* test, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果

1 纳米药物 IP 的合成与表征

纳米药物 IP 通过 Ppa 和 Ica 间的 π - π 堆积自组装制备而成, 为证实这一点, 通过在透射电子显微镜中观察纳米药物的形态。如图 1A, 游离 Ppa 和 Ica 由于具有疏水性, 在水中表现出严重的聚集行为。为得到理想的纳米药物, 调节 Ppa 与 Ica 的投料比, 并观察其形态 (图 1A)。随着 Ica 比例逐渐增高, 纳米药物的聚集现象得到明显改善, 粒径形态逐渐均匀, 表现出均匀的短棒状。其中 Ppa 与 Ica 投料比为 1:1 的纳米药物, 颗粒间形态差别较大, 有较多絮状物; 投料比为 1:2 时, 形成的纳米药物逐渐形成较为均匀的棒状物, 但粒径过大; 当投料比为 1:3 时, 呈现出形态均一的短棒状纳

米药物, 且分散性良好, 粒径较小。类似的结果通过马尔文纳米颗粒分析仪也能再次证实。如图 1B~D 所示, 3 种不同投料比的纳米药物经过马尔文纳米颗粒分析仪测量得出纳米药物的粒径大小及多分散系数。连续 7 天测量纳米药物的粒径大小及多分散系数, 以探究其在水中的稳定性 (图 1E~G)。在 7 天内, 相对于投料比为 1:1 和 1:2 形成的纳米药物, 投料比为 1:3 (Ppa:Ica) 的纳米药物的粒径大小和多分散系数较为稳定, 且无明显大颗粒。如图 1D、G 所示, 投料比为 1:3 (Ppa:Ica) 的纳米药物粒径稳定在 176 nm 左右, PDI 约为 0.171, 且测得电势为 -18.2 ± 0.45 mV (图 2A), 具有较好的稳定性。综合以上考虑, 选择投料比为 1:3 形成的纳米药物进行后续实验, 并命名为纳米药物 IP。

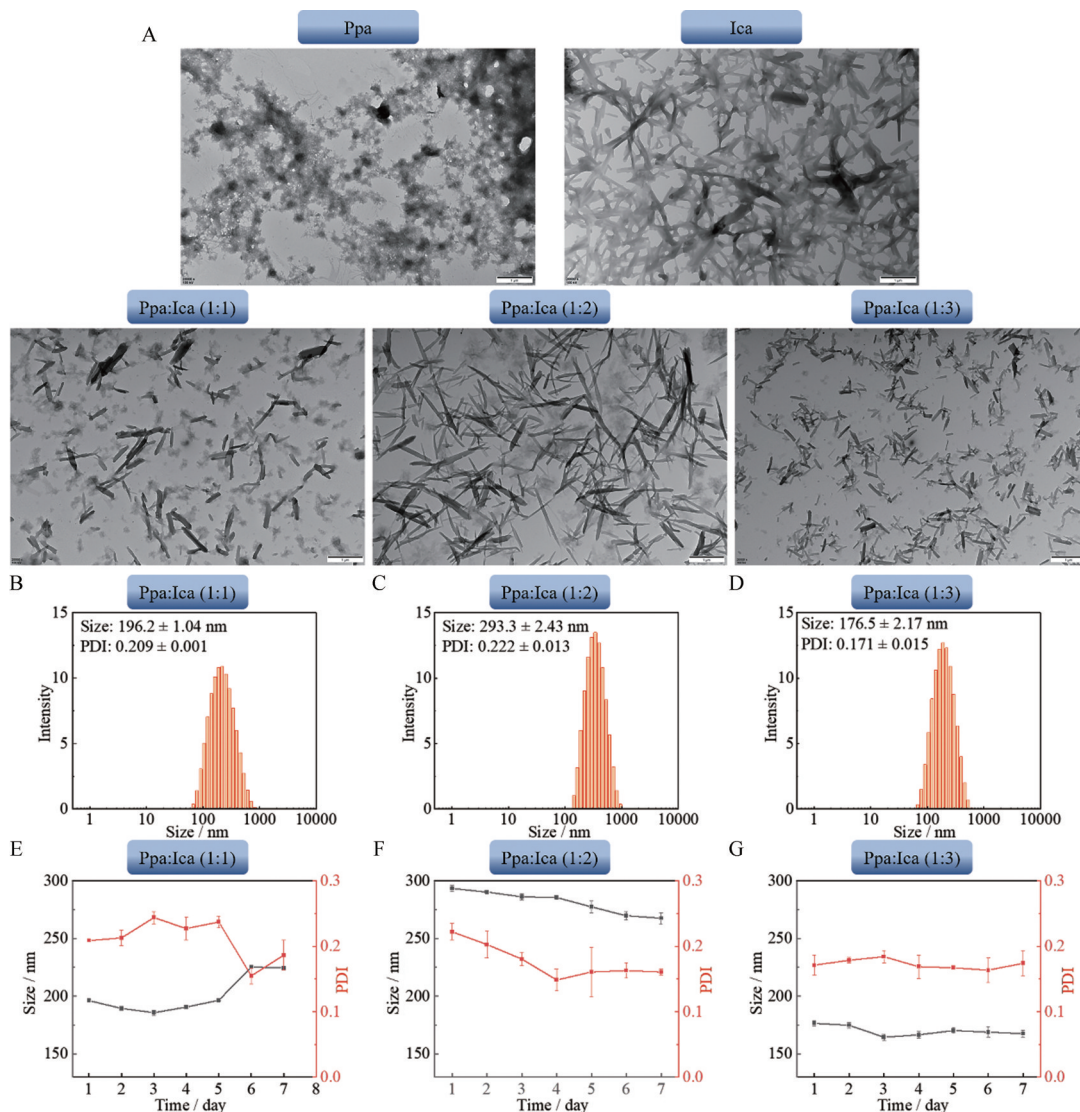


Figure 1 Synthesis and characterization of nanomedicine IP. A: Transmission electron microscopy (TEM) images of nanomedicine prepared with free pyropheophorbide-a (Ppa), icaritin (Ica) and their different feed ratios. Scale bar: 1 000 nm; B-D: The hydrodynamic size of Ppa and Ica nanomedicine with various feed ratios; E-G: The hydrodynamic size changes and the polydispersity index (PDI) changes of the self-assembled nanomedicines formed with different feed ratio of Ppa and Ica in water within 7 days. Ppa:Ica: 1:1 (B, E), 1:2 (C, F), 1:3 (D, G). $n = 3, \bar{x} \pm s$

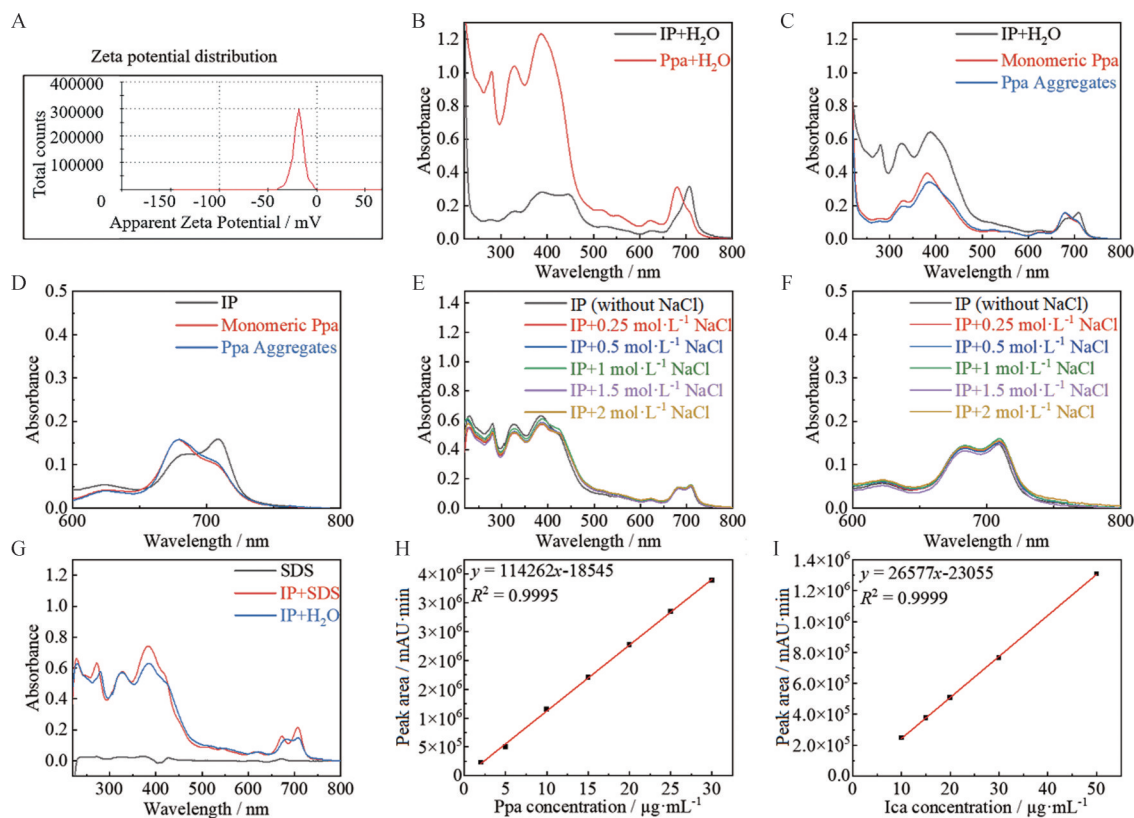


Figure 2 Characterization and drug loading of IP. A: The potential of IP; B: The ultraviolet-visible (UV-vis) absorbance of IP and Ppa in aqueous solution; C, D: The UV-vis absorbance (C) and the enlarged spectra (D) of IP, aggregated Ppa, and monomeric Ppa; E, F: The UV-vis absorbance (E) and the enlarged spectra (F) of IP after treatment with different concentrations of NaCl solutions; G: The UV-vis absorbance of IP in 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS) solutions; H, I: The regression curve of the peak area corresponding to the standard Ppa (H) and Ica (I)

2 纳米药物 IP 的表征与载药量

为进一步验证纳米药物 IP 是否组装成功, 使用紫外可见分光光度计分别检测 Ppa 和 IP 在水中的紫外光谱。从图 2B 可知, Ppa 在 660 nm 处有最大特征吸收峰, 但 IP 的最大特征吸收峰发生蓝移, 因此可得出 Ppa 与 Ica 可组装成纳米药物 IP。Ppa 在酸性水溶液中会聚集成团, 而在碱性水溶液中会呈分散状态。通过紫外光谱图可发现, 在酸碱环境中, Ppa 在 660 nm 处的最大吸收峰与 IP 在水中的有所区别, IP 的最大吸收峰出现明显红移 (图 2C、D), 表明分子间相互作用力影响了 IP 中 Ppa 的电子跃迁。而在不同浓度的氯化钠溶液中, 含相同浓度的 IP 溶液的紫外光谱几乎无变化 (图 2E、F), 证明在 IP 中, Ppa 与 Ica 这两个药物间不存在静电作用力。如图 2G 可知, 加入 0.2% SDS 后, IP 溶液在 660 nm 处出现蓝移, 证明纳米药物 IP 的组装是通过分子间疏水作用力形成的。通过高效液相色谱仪对 IP 的载药量与包封率进行探究。图 2H、I 分别为 Ppa 和 Ica 标准曲线, 通过纳米药物 IP 样品的峰面积测得所含有药物的具体浓度, 最后经过计算得出载药量和包封率。Ppa 和 Ica 的包封率分别为 24.52% 和 61.11%,

载药量分别为 16.45% 和 83.53%。综上所述, 纳米药物 IP 具有良好的稳定性、分散性和较高的载药量。

3 纳米药物 IP 的摄取能力

为验证纳米药物 IP 是否能比游离 Ppa 更易被 4T1 细胞摄取, 通过观察 4T1 分别经过 Ppa 和 IP 孵育一段时间后, 细胞内荧光强度的变化。结果显示, 保持孵育时间不变, 随着加药浓度升高, 红色荧光逐渐增强 (图 3A)。且自组装形成纳米药物 IP 后, IP 组的红色荧光相比同样浓度的 Ppa 更强。当保持加药浓度不变而孵育时间延长后, 红色荧光逐渐增强 (图 3B)。孵育 18 h 后, 细胞内的 Ppa 逐渐趋于饱和。图 3C、D 为对应的荧光强度统计结果。使用同样的孵育方法, 在流式细胞检测仪中可看到相似结果 (图 3E、F)。相比共聚焦显微镜拍摄的统计, 流式细胞仪方法检测的 Ppa 与 IP 在不同孵育时间的荧光强度的差别更大, 可能是由于细胞在摄入 Ppa 后在 PBS 中更易被细胞排出。但这些摄取实验可证明, 相对于游离的 Ppa, 纳米药物 IP 被 4T1 摄取的能力明显更强。

4 纳米药物 IP 增强的细胞中 ROS 的产生

上述实验验证了相对于 Ppa, 纳米药物 IP 被 4T1

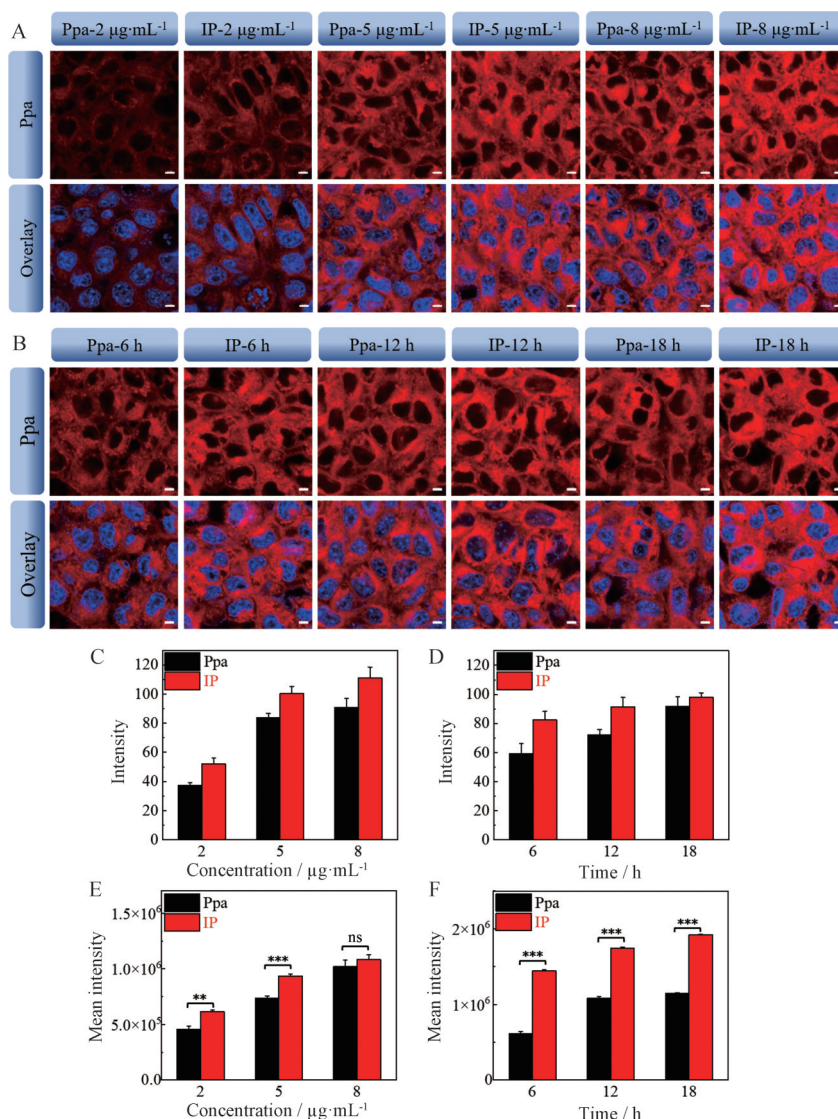


Figure 3 Cellular uptake of IP in 4T1 cells. A–D: Confocal laser scanning microscope (CLSM) images (A) and mean fluorescence intensity (MFI, C) of 4T1 cells treated with 2, 5, 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ppa or IP for 12 h; CLSM images (B) and MFI (D) of 4T1 cells after treatment with 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ppa or IP for 6, 12, or 18 h. Scale bar: 5 μm ; E: Flow cytometry analysis of 4T1 cells after incubation with 2, 5, and 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ppa or IP for 12 h; F: Flow cytometry analysis of 4T1 cells after incubation with 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ppa or IP for 6, 12, or 18 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ns: No significance

摄取的能力更强。因此继续研究了纳米药物 IP 能否促进 ROS 的产生。首先使用 SOSG 作为指示剂, 通过荧光光谱的变化值来评估各组药物单线态氧的产生 (图 4A)。在没有光照或无光敏剂的组别中, 荧光强度变化不大, 荧光倍数几乎没有增加, 表示这些组别产生的单线态氧可忽略不计。而 IP 组和 Ppa 组在光照后, 荧光强度明显增强, 倍数达到 7~8 倍。这表明 IP 和 Ppa 在溶液中能产生大量单线态氧。在细胞实验中, 使用 DCFH-DA 探针对不同组别产生的 ROS 进行检测 (图 4B)。无光照处理组由于没有产生 ROS, 几乎没有荧光。相反在各个光照组中, 都显示出明亮荧光, 其中 IP (+) 组的荧光强度要比其他组更强, 表明纳米

药物 IP 在光照后能产生出更多 ROS。同样地, 使用 CellROX™ Green 处理各组别细胞后能得到相似的结果 (图 4C), IP (+) 组荧光强度最强, 表明光照后纳米药物 IP 比其他组别产生更多 ROS, 与前面结果相似。

5 纳米药物 IP 诱导细胞自噬

根据文献^[21]报道, PDT 过程中产生的 ROS 可引发细胞自噬, 在使用自噬激活剂后, 自噬能进一步被激活。Ica 可激活线粒体自噬, 有研究表明^[15], Ica 激活自噬后线粒体的形态会由条状变成团状。从图 5A 可知, 加入 Ica 处理细胞后, 线粒体的形态由原来正常的线状, 变成聚集在一起的团状和球状, 表明 Ica 能激活自噬。此外, 本研究还通过 WB 分析了经过各组别处理

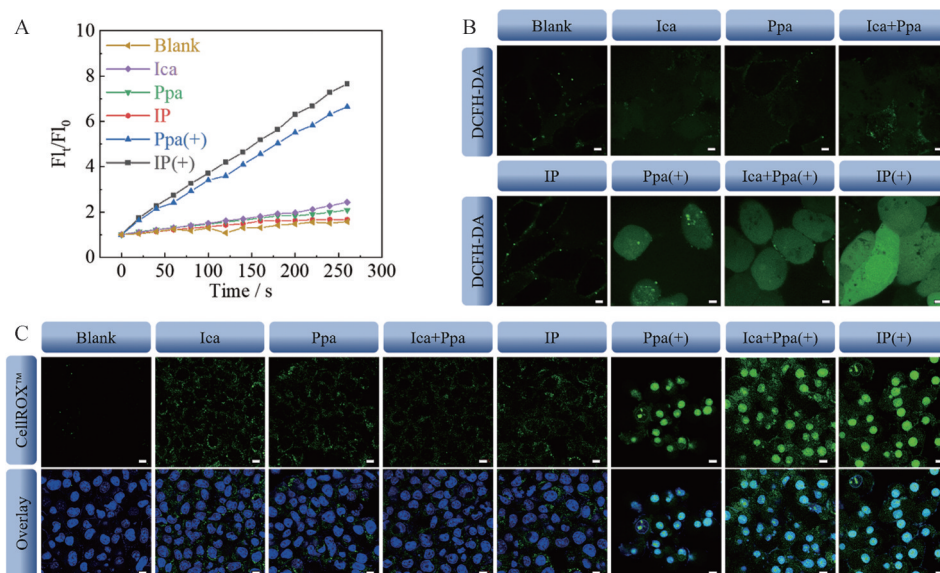


Figure 4 The production of reactive oxygen species (ROS) induced by IP light. A: With the increase of time, IP, Ica + Ppa, Ica and Ppa changed the fluorescence of singlet oxygen sensor green (SOSG) under light irradiation (20 s, 50 mW·cm⁻²) or no irradiation; B: CLSM images of 4T1 cells treated with IP, Ica + Ppa, Ica and Ppa (Ppa was 5 μg·mL⁻¹) for 12 h and stained with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). Scale bar: 5 μm; C: CellROX™ Green under light irradiation (1 min) or no irradiation. Scale bar: 10 μm

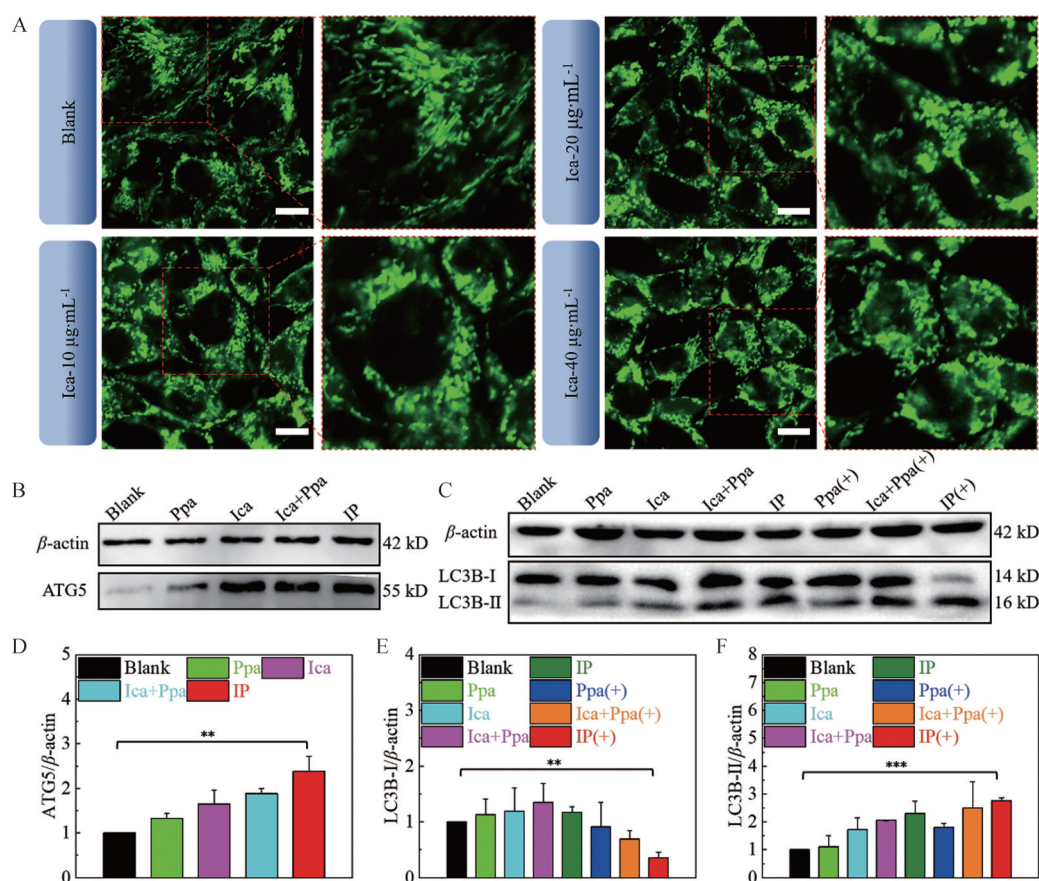


Figure 5 Autophagy induced by nanomedicine IP in 4T1 cells. A: CLSM images of mitochondria in 4T1 cells treated with 10, 20, and 40 μg·mL⁻¹ Ica for 12 h and stained with Rhodamine 123. Scale bar: 10 μm. The 4T1 cells were treated with each group of drugs (Ppa was 5 μg·mL⁻¹) for 12 h and then incubated under light irradiation (30 s) or no irradiation for another 4 h; B, C: The levels of ATG5 (B) and LC3B (C) were determined by Western blot; D–F: Quantitative analysis of relative ATG5 (D), LC3B-I (E) and LC3B-II (F) expression. ATG5: Autophagy related protein 5; LC3B: Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

4T1 细胞后 ATG5 和 LC3B 的表达, 来判定纳米药物对自噬的激活程度。从 WB 条带可看出, 加入 Ica 后 ATG5 表达明显增加, 表明了自噬的激活 (图 5B)。经过统计后得出, 纳米药物 IP 组中 ATG5 的增加最高, 且具有统计学意义, 表明纳米药物 IP 能有效激活自噬。LC3B-I 在经过纳米药物 IP 处理和光照后明显下降 (图 5C)。Ica 可上调 LC3B-II 表达, 形成纳米药物 IP 后, LC3B-II 的表达量更高, 这些结果都具有统计学意义 (图 5D~F), 表明纳米药物 IP 通过提高细胞的摄取进而促进自噬的激活。Ppa (+) 组别的 LC3B-II 表达量会轻微上调, 且纳米药物 IP (+) 光照后 LC3B-II 的表达量最高, 证实了纳米药物 IP 介导的 PDT 能有效激活自噬。

线粒体形态的改变及自噬相关蛋白表达的变化不仅证明自噬激活剂 Ica 会引发细胞自噬, 也表明 PDT 过程中产生的 ROS 可进一步引发细胞的自噬。而且由于纳米药物 IP 有更强的细胞摄取能力, 促进自噬的效果比游离组更强, 证明了纳米药物 IP 能协同 PDT 与自噬激活剂共同激活自噬。

6 纳米药物 IP 诱导的自噬与 ROS 协同促进细胞凋亡

为了验证纳米药物 IP 产生的 ROS 与诱导的自噬是否可协同促进 PDT 引起的细胞凋亡, 比较各组药物处理后对细胞的毒性。在 MTT 实验中, 低剂量 Ica 几乎没有毒性 (图 6A), 高剂量时显示轻微毒性, 表明过度自噬可诱发凋亡。而上述结果 (图 5) 表明, Ica 联合

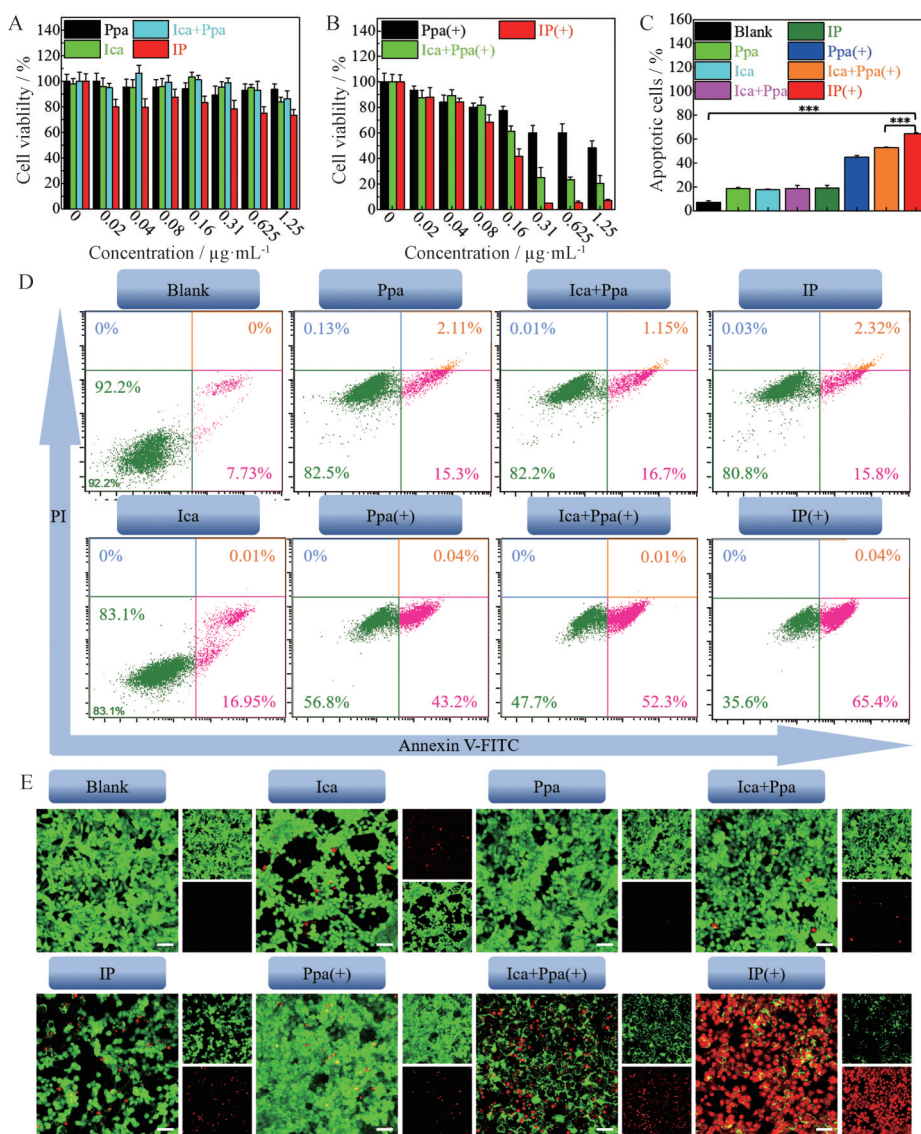


Figure 6 Cytotoxicity of IP with or without light. A, B: The 4T1 cell viability was detected by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) method. 4T1 cells are treated by the gradient concentration of different drugs (the highest concentration is Ppa was 10 µg·mL⁻¹) for 12 h, and under no irradiation (A) or light (10 s) irradiation (B), continue to incubate for 12 h (*n* = 6); C, D: Apoptosis analysis and statistical charts of 4T1 cells after treatment for 12 h of different drugs (Ppa was 10 µg·mL⁻¹), under no irradiation or light (30 s) irradiation (*n* = 3); E: Live/dead cell staining of 4T1 cells after treatment for 6 h with each group of drugs (Ppa was 10 µg·mL⁻¹) under no irradiation or light (3 min) irradiation (*n* = 8). Scale bar: 50 µm. $\bar{x} \pm s$. ****P* < 0.001. PI: Propidium iodide; FITC: Fluorescein isothiocyanate

PDT可进一步引发细胞自噬。本结果也表明这一点, 经过光照后, Ica + Ppa (+) 组和 IP (+) 组都表现出非常明显的细胞毒性 (图 6B), 且明显比游离 Ppa (+) 组或游离 Ica 组的细胞毒性更强, 表明 Ica 与 PDT 协同治疗后, 能通过增强自噬加强 PDT 治疗效果。IP (+) 组表现明显剂量依赖性且相对于游离的 Ica + Ppa (+) 毒性更强, 这也体现出纳米药物 IP 良好的摄取作用, 证实了 IP (+) 组具有最强的抗肿瘤能力。此外, 使用流式细胞仪对各组别处理后的细胞进行凋亡分析, 结果与 MTT 结果类似, 如图 6C、D 所示, 细胞分群结果显示, 纳米药物 IP 经光照后, 细胞发生凋亡的数量占比最多, 可达 65.4%, 与其他组别相比也具有统计意义。最后, 使用钙黄绿素和碘化丙啶荧光染料对各组别的活细胞和死细胞进行区分, 通过共聚焦比较各组别的抗增殖能力, 绿色荧光表示活细胞, 红色荧光表示死细胞 (图 6E)。没有光照时, 各组别几乎没有毒性或毒性很小。经过光照后, 游离的 Ppa (+) 只有少量红色荧光, 加入游离的 Ica 与 Ppa 共同处理细胞后, 红色荧光加强, 而 IP (+) 组荧光强度最强, 表明自噬与 PDT 协同造成癌细胞死亡。上述这些结果都表明了, 在光照条件下, 纳米药物 IP 可通过激活自噬来协同 PDT, 并显示出有效的抗细胞增殖和抗肿瘤治疗效果, 体现出自组装策略对于光动力肿瘤治疗具有巨大潜力。

讨论

作为一种细胞的新陈代谢反应, 自噬既有可能保护细胞, 也有可能使细胞发生凋亡, 这取决于自噬发生的程度^[21]。本研究表明, 低剂量 Ica 引发的自噬不足以令细胞发生死亡, 还有可能促进细胞增殖 (图 6A)。而当 Ica 达到 $13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率有所下降, 表明过度的自噬超过细胞所能承受的压力后, 引发细胞凋亡。而 PDT 中光敏剂产生的 ROS 也是自噬的重要诱导物, 游离的 Ppa (+) 诱导的自噬程度与游离的 Ica 组几乎相同 (图 5E、F)。Ica 与光敏剂联用后, 明显增强了自噬效果, 实验也验证了 Ica + Ppa (+) 与 IP (+) 组的自噬程度与细胞毒性程度都表现出 $1 + 1 > 2$ 的效果 (图 5E、F 和图 6B)。

本研究设计了一种通过 Ica 与 Ppa 自组装形成的纳米药物 IP, 可有效增强光敏剂被细胞摄取的能力, 且具有较强的稳定性和良好的分散性, 同时表现出良好的载药量和包封率。纳米药物 IP 摄取进入细胞后, 在光照条件下产生的 ROS 会诱导细胞发生保护性自噬, 而 Ica 作为自噬诱导剂能进一步激活自噬, 并将保护细胞的自噬从促进细胞存活转化成促进细胞发生凋亡。实验证实了 IP 中的 Ica 能协同 PDT 带来的过度自噬与

光敏剂产生的 ROS 共同促进小鼠乳腺癌细胞凋亡, 产生良好的抗肿瘤效果。本研究提出了一种合成方法简单而有效地促进自噬协同 PDT 的策略, 将有助于自组装纳米药物与 PDT 协同抗肿瘤机制的进一步研究。

作者贡献: 关润钿主要负责文章中数据的收集、分析与解释及稿件撰写; 郑蓉蓉主要负责研究文章的构思、设计与文章修改; 杨妮、饶小娜在数据收集及文章修改中给予帮助; 李仕颖主要负责资金支持及指导文章修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Jia XL, Liu YJ, Li M, et al. Anti-tumor nanoscale drug delivery systems based on photodynamic therapy [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 3421-3430.
- [2] Yang HY, Liu RF, Xu YX, et al. Photosensitizer nanoparticles boost photodynamic therapy for pancreatic cancer treatment [J]. Nanomicro Lett, 2021, 13: 35.
- [3] Lőrincz P, Juhász G. Autophagosome-lysosome fusion [J]. J Mol Biol, 2020, 432: 2462-2482.
- [4] Song C, Xu W, Wu H, et al. Photodynamic therapy induces autophagy-mediated cell death in human colorectal cancer cells via activation of the ROS/JNK signaling pathway [J]. Cell Death Dis, 2020, 11: 983.
- [5] Xiang HG, Zhang JF, Lin CC, et al. Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 569-581.
- [6] Karampa AD, Goussia AC, Glantzounis GK, et al. The role of macroautophagy and chaperone-mediated autophagy in the pathogenesis and management of hepatocellular carcinoma [J]. Cancers, 2022, 14: 760.
- [7] Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21: 439-458.
- [8] Honda S, Arakawa S, Yamaguchi H, et al. Association between Atg5-independent alternative autophagy and neurodegenerative diseases [J]. J Mol Biol, 2020, 432: 2622-2632.
- [9] Yim WWY, Mizushima N. Lysosome biology in autophagy [J]. Cell Discov, 2020, 6: 6.
- [10] Upadhyay A. Natural compounds in the regulation of proteostatic pathways: an invincible artillery against stress, ageing, and diseases [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11: 2995-3014.
- [11] Zhu YX, Jia HR, Gao G, et al. Mitochondria-acting nanomicelles for destruction of cancer cells via excessive mitophagy/autophagy-driven lethal energy depletion and phototherapy [J]. Biomaterials, 2020, 232: 119668.
- [12] Liu Y, Wang Y, Liu J, et al. Interplay between MTOR and GPX4 signaling modulates autophagy-dependent ferroptotic cancer cell death [J]. Cancer Gene Ther, 2021, 28: 55-63.
- [13] Lopes TZ, De Moraes FR, Tedesco AC, et al. Berberine asso-

- ciated photodynamic therapy promotes autophagy and apoptosis *via* ROS generation in renal carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109794.
- [14] Bailly C. Molecular and cellular basis of the anticancer activity of the prenylated flavonoid icaritin in hepatocellular carcinoma [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 325: 109124.
- [15] Yu Z, Guo JF, Hu MY, et al. Icaritin exacerbates mitophagy and synergizes with doxorubicin to induce immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma [J]. *ACS Nano*, 2020, 14: 4816-4828.
- [16] Siwawannapong K, Zhang R, Lei HL, et al. Ultra-small pyropheophorbide-a nanodots for near-infrared fluorescence/photoacoustic imaging-guided photodynamic therapy [J]. *Theranostics*, 2020, 10: 62-73.
- [17] Moghassemi S, Dadashzadeh A, Azevedo RB, et al. Photodynamic cancer therapy using liposomes as an advanced vesicular photosensitizer delivery system [J]. *J Control Release*, 2021, 339: 75-90.
- [18] Cheng X, Gao J, Ding Y, et al. Multi-functional liposome: a powerful theranostic nano-platform enhancing photodynamic therapy [J]. *Adv Sci*, 2021, 8: 2100876.
- [19] Li YJ, Zhang MY, Han HJ, et al. Peptide-based supramolecular photodynamic therapy systems: from rational molecular design to effective cancer treatment [J]. *Chem Eng J*, 2022, 436: 135240.
- [20] Liu YT, Wang YQ, Zhang SW, et al. Advance on small molecule self-assembled nano-drug delivery system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 516-529.
- [21] Deng Y, Song P, Chen X, et al. 3-Bromopyruvate-conjugated nanoplatfrom-induced pro-death autophagy for enhanced photodynamic therapy against hypoxic tumor [J]. *ACS Nano*, 2020, 14: 9711-9727.