

一氧化氮和光动力协同治疗的自组装纳米粒的制备及其药效学评价

卡迪热娅·艾克拉木, 白静雅, 仲春红, 张倩, 苏文君, 王梅* (新疆医科大学药学院, 教育部工程研究中心新疆及中亚特色医药资源教育部工程研究中心, 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室, 乌鲁木齐 830017)

摘要:目的 合成及制备一氧化氮供体-酞菁硅偶联前药自组装纳米粒(NO-SiPc-NO@ NPs), 并对纳米粒的制剂学特性和药效学进行初步评价。方法 通过化学反应合成了氧化吡嗪类 NO 供体-酞菁硅光敏剂偶联物。采用纳米沉淀法制备 NO-SiPc-NO@ NPs, 并以粒径、多分散系数(PDI)和 Zeta 电位为评价指标, 考察 NO-SiPc-NO 的浓度、水相转速、有机相与水相体积比以及稳定剂 DSPE-PEG_{2K} 含量等因素的影响; 分别用 Griess 法和化学探针法检测纳米粒的体外 NO 和活性氧(ROS) 产生以及光稳定性; 在此基础上, 考察 NO-SiPc-NO@ NPs 的贮存稳定性及在不同 pH 的磷酸缓冲盐溶液中的体外解聚情况; 最后, 采用 CCK-8 法检测纳米粒光动力效果, 通过荧光探针观察自组装纳米粒对细胞内 NO 的影响。结果 ¹H-NMR 结果显示, NO-SiPc-NO 被成功合成。最佳制备工艺条件为: NO-SiPc-NO 质量浓度为 2.5 mg · mL⁻¹、转速为 1 000 r · min⁻¹、有机相与水相体积比为 1:3 和稳定剂含量为 40%; 所制备的自组装纳米粒粒径、PDI 和电位分别为 (111.467 ± 3.365) nm, (0.123 ± 0.035) 和 (-11.433 ± 0.850) mV; 透射电镜下纳米粒呈球形或类球形, 形态较为完整, 分布均匀; NO 与 ROS 释放结果表明, 纳米粒在溶液中能释放 NO 和 ROS, 并具有良好的光稳定性; NO-SiPc-NO@ NPs 在两种条件下稳定性较好, 其粒径、电位、PDI、NO-SiPc-NO 的包封率和载药量均无明显变化; 体外纳米粒解聚实验结果表明, NO-SiPc-NO@ NPs 具有缓释性, 并且其遵循一级动力学模型; CCK-8 实验结果显示纳米粒组均呈现出剂量依赖性细胞毒性, 且光照后的 NO-SiPc-NO@ NPs 对 MCF-7 细胞具有更强的光动力效果; 在 NO 测定实验中, NO-SiPc-NO@ NPs 在胞内能产生大量的 NO。结论 成功制备 NO-SiPc-NO@ NPs, 所制备的自组装纳米粒具有良好的光动力活性, 并实现了 NO 的有效递送, 为气体疗法和光动力疗法的协同治疗奠定了理论基础。

关键词: 一氧化氮供体-酞菁硅偶联前药自组装纳米粒; 一氧化氮; 光敏剂; 自组装纳米粒; 偶联物; MCF-7 细胞

doi:10.11669/cj.2025.01.007 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)01-0055-11

Preparation and Pharmacodynamics Evaluation of Self-Assembled Nanoparticles for Synergistic Treatment of NO and Photodynamic Therapy

Kadireya · Aikelamu, BAI Jingya, ZHONG Chunhong, ZHANG Qian, SU Wenjun, WANG Mei* (College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Engineering Research Center of Xinjiang and Central Asian Medicine Resources, Ministry of Education, Xinjiang Key Laboratory of Natural Medicines Active Components and Drug Release Technology, Urumqi 830017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesize and prepare nitric oxide donor (NO donor)-silicon phthalocyanine (SiPc) conjugated prodrug self-assembled nanoparticles (NO-SiPc-NO@ NPs) and preliminarily evaluate their formulating properties and pharmacodynamics. **METHODS** Furoxan NO donor-phthalocyanine silicon photosensitizer couplings were synthesized by chemical reactions. The NO-SiPc-NO@ NPs were prepared using a nanoprecipitation method, and the effects of different concentrations of NO-SiPc-NO, rotational speed, the volume ratio of the organic phase to the aqueous phase, and the content of the stabilizer DSPE-PEG_{2K} on particle sizes, polydispersity index (PDI), and Zeta potential of NO-SiPc-NO@ NPs were investigated to obtain the better prescriptions. The release of NO and reactive oxygen species (ROS) yields as well as the photostability of NO-SiPc-NO were detected by the Griess method and the chemical probe method, respectively. On this basis, the storage stability and *in vitro* release of NO-SiPc-NO@ NPs in phosphate buffer salt solutions of different pH were investigated. Finally, the photodynamic effect of nanoparticles was detected by CCK-8 method, and the effect of self-assembled nanoparticles on intracellular NO was observed by fluorescent probe. **RESULTS** The ¹H-NMR results showed that NO-SiPc-NO was successfully synthesized. The optimal preparation process conditions were: NO-SiPc-NO concentration of 2.5 mg · mL⁻¹, rotational speed of 1 000 r · min⁻¹, organic phase to aqueous phase volume ratio of 1:3 and stabilizer content of 40%. The prepared self-assembled nanoparticles were (111.467 ± 3.365) nm, (0.123 ± 0.035) and (-11.433 ± 0.850) mV in particle size, PDI and Zeta potential, respectively. The nanoparticles in transmission electron microscopy were spherical or spheroidal in shape, with a more intact morphology and homogeneous distribution. The results of NO and ROS release showed that the

基金项目: 新疆维吾尔自治区研究生科研创新项目资助(XJ2023G197); 新疆天然活性组分和释药技术重点实验室项目资助(XJDX1713)

作者简介: 卡迪热娅·艾克拉木, 女, 硕士研究生 研究方向: 药物新剂型和靶向给药剂的研究 * **通讯作者:** 王梅, 女, 博士, 教授, 博士生导师 研究方向: 药物新剂型和靶向给药剂的研究 Tel: (0991)2110360

nanoparticles could release NO and ROS in solution with good photostability. NO-SiPc-NO@ NPs were stable under both conditions, and there was no significant change in particle size, potential, PDI, encapsulation rate and drug loading. The results of *in vitro* drug release experiments showed that NO-SiPc-NO@ NPs had a slow release and that their release followed a one-level kinetic model. CCK-8 experiments showed that all nanoparticle groups showed dose-dependent cytotoxicity, and the light-exposed NO-SiPc-NO@ NPs had a stronger photodynamic effect on MCF-7 cells. In NO assay experiments, NO-SiPc-NO@ NPs can produce large amounts of NO intracellularly. **CONCLUSION** NO-SiPc-NO@ NPs are successfully prepared and the prepared self-assembled nanoparticles have good photodynamic activity and realize effective delivery of NO, which lays a theoretical foundation for the synergistic treatment of gas therapy and photodynamic therapy.

KEY WORDS: NO-SiPc-NO@ NPs; nitric oxide; photosensitizer; self-assembled nanoparticle; conjugation; mCF-7 cell

光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 是利用光敏剂 (photosensitizer, PS) 和特定波长的光与氧相互作用产生细胞毒性活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 从而在靶组织中触发细胞凋亡和/或坏死的治疗方法^[1], 已被广泛用于实体肿瘤的治疗中。光敏剂作为光动力治疗中最为重要的因素之一, 受到越来越多人们的重视和广泛研究。其中酞菁 (phthalocyanines, Pcs) 作为第二代光敏剂, 具有 18 个 π 电子的平面共轭核的大环分子。除了作为催化剂和光电子材料的独特优势外, 还显示出作为光动力治疗剂的优异性能^[2]。酞菁类光敏剂的激发波长在 670 ~ 690 nm, 在近红外光谱范围内具有很高的吸收能力, 对光的稳定性较好, 有助于其在光敏剂和光催化反应中的应用^[3-4]。大部分酞菁类光敏剂分子之间就会发生聚集, 从而导致水中的溶解度较低, 这限制了其在生物医学领域的应用, 但可以通过合成改性或利用药物递送系统来克服这个问题^[5]。在酞菁分子轴向上引入体积较大的取代基, 由于其空间位阻, 能够明显地抑制酞菁分子之间的聚集行为, 也可提高化合物的光动力疗效^[6-7]。

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是一种亲脂性、高度扩散性和短寿命的信号分子。低浓度的 NO 可作用于肿瘤发生发展中的信号通路, 从而促进肿瘤的发展、侵袭。然而, 高浓度的 NO 则促进 DNA 损伤、蛋白质功能障碍、基因突变和细胞死亡^[8]。此外, NO 还被认为其他治疗方法的增敏剂, 如化疗、放射治疗、光疗和免疫疗法^[9-11]。尽管具备相当显著的优点, 基于 NO 的癌症治疗仍然受到半衰期短和靶外效应的限制。

自组装纳米粒 (self-assembled nanoparticles, SAN) 是指由分子自发聚集形成的纳米粒子。这些分子可以通过非共价作用力 (如静电作用、范德华力、氢键等) 相互作用, 形成具有一定结构和功能的纳米粒子^[12-13]。SAN 可以改变药物的理化性质, 如提高药物的溶解度和化学稳定性, 其还可改变药物体内药物动力学特征, 增加肿瘤细胞的摄取, 从而增

强药物的药效, 减轻药物副作用, 因此, 在癌症的治疗中是一种非常有前景的载体^[14-16]。

因此, 本研究拟制备用酯键连接 NO 供体 [3-苯磺酰基-4-(1-羟基醚)-1,2,5-噁二唑-2-氧化物] 和酞菁硅光敏剂构建药物-药物结合物, 提高酞菁硅光敏剂的溶解性及光动力效果, 还能使其具有释放 NO 的能力。利用稳定剂使得偶联物在水中自组装成纳米粒 (NO-SiPc-NO@ NPs), 进一步提高了偶联物的水溶性, 并对纳米粒理化性质、NO-SiPc-NO 的封装率、解聚情况进行研究。通过细胞实验进行药效学初步评价, 以为后续研究提供实验基础。

1 材料

1.1 主要仪器

UV-2700 型紫外可见分光光度计 [岛津 (上海) 实验器材有限公司], R-2003 型旋转蒸发仪, SHZ-95B 型循环水式多用真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司), HWS-24 型电子恒温水浴锅 (上海一恒科学仪器有限公司), KQ5200DE 型超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), BSA124S 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司), Nano ZS 型纳米粒径仪 (英国 Malvern 公司), 371 型 CO₂ 培养箱, Herasafe™ KS 型 II 级生物安全柜 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 85-2 型恒温磁力搅拌器 (常州金坛精达仪器制造有限公司), Victor Nivo 型多功能酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司), JEM-1400 plus 型透射电镜, SX-500 型全自动高压灭菌锅 (日本 Tomy Digital Biology 公司)。

1.2 主要药品与试剂

NO 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: 061322221202), DPBF (上海懋康生物科技有限公司, 批号: 2106X230943), 乙腈为色谱级, 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (艾伟拓上海医药科技有限公司, 批号: C20128), CCK-8 试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: BA03175388), DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司, 批

号:6123109)、青霉素、链霉素溶液(青链霉素混合溶液),胰酶,磷酸盐缓冲液(美国 Gibco 公司,批号分别 2129299、2186962、8121247),四氢呋喃(THF,天津市致远化学试剂有限公司,分析纯)、NO 供体(本实验室自制,批号为:20231212),SiPcCl₂(上海毕得医药科技股份有限公司,纯度:90%)

1.3 细胞

MCF-7 细胞和 HeLa 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司)。

2 方法

2.1 NO-SiPc-NO 的合成与表征

2.1.1 NO-SiPc-NO 的合成 将 SiPcCl₂ (200 mg, 0.327 mmol) 和 NO 供体(482 mg, 0.981 mmol) 在甲苯(10 mL)中搅拌回流 36 h^[17]。待反应结束后,过滤反应体系,滤液经减压浓缩除去溶剂,得固体。粗品经硅胶柱层析,以 PE-EA-MeOH(4:1:0.2) + 3% TEA 为洗脱剂进行洗脱,得到蓝绿色固体 NO-SiPc-NO。合成路线见图 1。

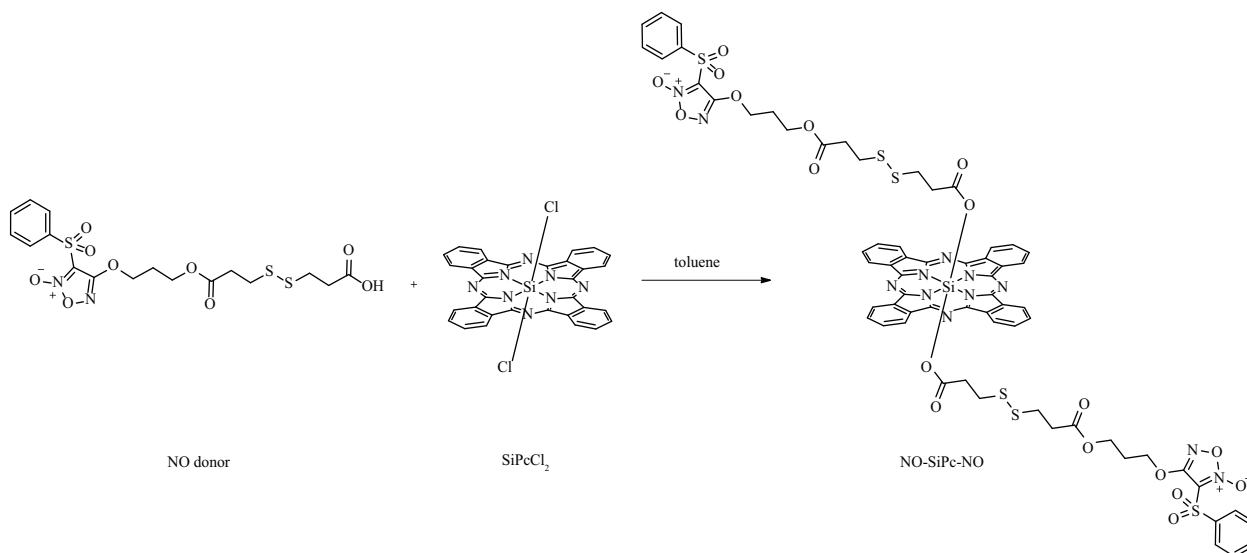


图 1 一氧化氮供体-酞菁硅光敏剂偶联物(NO-SiPc-NO)的合成路线图

Fig. 1 Synthesis of NO-SiPc-NO

2.1.2 NO-SiPc-NO 的 NMR 分析 取 20 mg NO-SiPc-NO 偶联物溶于氘代氯仿中,用 Unity-Inova600 核磁共振仪进行¹H-NMR 测定。

2.1.3 NO-SiPc-NO 的 IR 分析 取 3 mg NO-SiPc-NO 偶联物,与适量溴化钾混合压片,用 IRPrestige-21 进行测定。

2.2 NO-SiPc-NO 含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 选择 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相为乙腈-水体(93:7);流速为 1.0 mL · min⁻¹;检测波长为 356 nm;柱温为 25 °C;进样量为 10 μL。

2.2.2 专属性考察 取 NO-SiPc-NO 溶液,用乙腈稀释至一定浓度,以不含 NO-SiPc-NO 的溶剂为空白,按照“2.2.1”项下色谱条件下进样分析。

2.2.3 NO-SiPc-NO 标准曲线的建立 精密称取 NO-SiPc-NO 5 mg,用色谱乙腈溶解,并定容至 10 mL,制成质量浓度为 0.5 mg · mL⁻¹的 NO-SiPc-NO 贮备液。将 NO-SiPc-NO 贮备液用乙腈稀释得

到质量浓度为 1、5、10、30、40 μg · mL⁻¹ 的系列溶液,并用“2.2.1”项下的色谱条件记录峰面积,以峰面积(A)对质量浓度(ρ)进行线性回归。

2.2.4 精密度考察 分别取 5、10、30 μg · mL⁻¹ (低、中、高质量浓度)的 NO-SiPc-NO 溶液,24 h 内连续进样 3 次,记录 3 个质量浓度下 NO-SiPc-NO 的峰面积,计算日内精密度。连续 3d 内每天分别进样检测 1 次,记录峰面积,计算日间精密度。

2.2.5 加样回收率试验 取低(5 μg · mL⁻¹)、中(10 μg · mL⁻¹)、高(30 μg · mL⁻¹) 3 个质量浓度的 NO-SiPc-NO 溶液,回收率为测得量与加入量的比值。

2.3 NO-SiPc-NO@NPs 的制备

采用纳米沉淀法制备了 NO-SiPc-NO 自组装纳米粒^[18]。具体实验步骤为:首先,精密称取 30.0 mg NO-SiPc-NO,加入 THF 溶解并定容至 10 mL,配置浓度为 3 mg · mL⁻¹ NO-SiPc-NO 溶液。往上述溶液中加入 12 mg DSPE-PEG_{2K} 溶解至质量分数为 40% DSPE-PEG_{2K} 的 NO-SiPc-NO THF 溶液。在一定条件

下,缓慢滴入到纯水中搅拌 5 min,使其自组装成为纳米粒溶液(NO-SiPc-NO@ NPs),进一步透析 6 h,除去未自组装的游离药物和有机溶剂,得到蓝色自组装纳米粒溶液。

2.4 单因素考察

以粒径、多分散系数(PDI)以及 Zeta 电位为评价指标,考察有机相与水相体积比(1:3、1:6、1:9),稳定剂 DSPE-PEG_{2K} 含量(30%、40%、50%),水相转速(800、1 000、1 200 r·min⁻¹)以及 NO-SiPc-NO 的质量浓度(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg·mL⁻¹)等不同影响因素对 NO-SiPc-NO@ NPs 稳定性的影响以获取较好处。

2.4.1 NO-SiPc-NO 质量浓度的影响 取 30 mg NO-SiPc-NO 溶于 10 mL THF 里,配制成浓度为 3 mg·mL⁻¹的贮备液。量取适量贮备液分别稀释成 1.0、1.5、2.0、2.5 mg·mL⁻¹的 NO-SiPc-NO THF 溶液。取 1 mL 加入 1 mg DSPE-PEG_{2K} 溶解后,在一定制备温度及搅拌速度下,缓慢加入到 3 mL 水里使其自组装成 NO-SiPc-NO@ NPs 溶液。纳米粒溶液透析过夜,除去未自组装的游离药物。采用粒度分析仪测定 NO-SiPc-NO@ NPs 的粒径、PDI 和 Zeta 电位。

2.4.2 搅拌速度的影响 配制 2.5 mg·mL⁻¹的 NO-SiPc-NO THF 溶液,取 1 mL 加入 1 mg DSPE-PEG_{2K} 溶解后,在一定制备温度下分别注入到搅拌速度分别为 800、1 000、1 200 r·min⁻¹的 3 mL 水里使其自组装成 NO-SiPc-NO 纳米粒溶液。透析过夜后,通过粒度分析仪测定 NO-SiPc-NO@ NPs 的粒径、PDI 和 Zeta 电位。

2.4.3 稳定剂 DSPE-PEG₂₀₀₀ 含量的影响 配制 2.5 mg·mL⁻¹的 NO-SiPc-NO THF 溶液,取 1 mL 分别加入不同含量(30%、40%及 50%)的 DSPE-PEG₂₀₀₀ 溶解后,注入到搅拌速度为 1 000 r·min⁻¹的水里使其自组装成 NO-SiPc-NO 纳米粒溶液。透析过夜后,通过粒度电位分析仪来分析测定 NO-SiPc-NO@ NPs 的粒径、PDI 和 Zeta 电位。

2.4.4 有机相水相体积比的影响 配制 2.5 mg·mL⁻¹的 NO-SiPc-NO THF 溶液 4 mL,加入 4 mg DSPE-PEG₂₀₀₀ 溶解后,在一定制备温度及搅拌速度下,分别取 1 mL 注入到 3、6、9 mL 水里使其自组装成 NO-SiPc-NO 纳米粒溶液。透析过夜后,通过粒度电位分析仪来分析测定 NO-SiPc-NO@ NPs 的粒径、PDI 和 Zeta 电位。

2.5 NO-SiPc-NO@ NPs 的表征

2.5.1 外观及微观形态表征 采用透射电镜观察

NO-SiPc-NO@ NPs 的形态^[19]。具体方法是:取适量 NO-SiPc-NO@ NPs,将纳米粒用去离子水稀释后滴到具有碳膜的铜网上,自然挥干后,使用 10% 磷钼酸染色 10 min,将样品置于透射电镜(JEM-1400 plus)下观察纳米粒的形态。

2.5.2 NO-SiPc-NO 包封率和载药量的测定 采用高效液相色谱法测定纳米粒中 NO-SiPc-NO 的包封率和载药率。NO-SiPc-NO 包封率和载药量使用公式 1~2 计算:

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{自组装的药物质量}}{\text{总添加的药物质量}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{自组装的药物质量}}{\text{载体总质量}} \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

其中,自组装的药物质量是纳米粒经透析去掉未自组装的游离 NO-SiPc-NO 后,用乙腈稀释 100 倍,超声破乳后,采用 HPLC 测定 NO-SiPc-NO 含量。

2.5.3 NO-SiPc-NO@ NPs 的稳定性评价 为了评价自组装纳米粒的稳定性,将 NO-SiPc-NO@ NPs 分别在室温和 4 ℃ 条件下贮存放置 30 d,于不同的时间(1、3、5、8、14、22 及 30 d)测定粒径、电位、PDI、NO-SiPc-NO 包封率与载药量以考察纳米粒的贮存稳定性。

2.5.4 NO-SiPc-NO@ NPs 的解聚情况 采用低速离心法进行纳米粒体外解聚情况研究。精密移取 0.5 mg·mL⁻¹ NO-SiPc-NO@ NPs 1 mL 置于 10 mL 磷酸盐缓冲液(pH 值 6.8 和 5.0)中,分别置于(37±2)℃ 恒温水浴振荡器中振荡,于不同时间点(0、1、2、5、8、12、24 和 48 h)取样 1 mL 置于离心管中,并补充相同体积的磷酸盐缓冲液。将离心管置于离心机上,离心机转速设置为 3 000 r·min⁻¹,离心机时间设置为 10 min,离心机温度设置为 25 ℃。离心得到的沉淀物用乙腈溶解至 1 mL,过 0.22 μm 过滤测定。按照“2.2.1”项下测定 NO-SiPc-NO 的含量,并作出累计解聚曲线。

2.6 NO-SiPc-NO@ NPs 的性质评价

2.6.1 NO 释放实验 用 Griess 法进行体外 NO 释放研究^[20]。

分别用含过量 L-半胱氨酸(5 mmol)的磷酸盐缓冲溶液配置浓度均为 25 μmol·L⁻¹的 NO-SiPc-NO 和 NO-SiPc-NO@ NPs 溶液。将上述溶液置于 37 ℃ 恒温水浴中孵化,于不同时间点取反应液 50 μL,分别加入 50 μL Griess Reagent I 和 Griess Reagent II,

室温放置 10 min,在 540 nm 波长处测吸光度。计算 NO 释放量,以亚硝酸盐(NO_2^-)的量表示。

2.6.2 体外 ROS 测定 使用化学探针法检测 NO-SiPc-NO 的活性氧产量。1,3-二苯基异苯并呋喃(1,3-diphenylisobenzoruran, DPBP)是一款荧光探针,长期以来认定其高特异性结合某些活性氧类型^[21]。DPBP 与活性氧(reactive oxygen species, ROS)结合,不可逆氧化,紫外可见光 415 nm 处的吸收强度迅速降低。

以 THF 为溶剂,配制浓度为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPBF 溶液。分别用 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPBF 溶液稀释 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NO-SiPc-NO 和 NO-SiPc-NO@NPs 溶液至浓度为 $3.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将混合溶液置于石英比色皿中,用 680 nm 激光器(功率密度: $500 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$)照射,在 0、10、20、30、40、60、80、100、120、150 和 200 s 进行全波长扫描。

2.6.3 NO-SiPc-NO 光稳定性 配制 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NO-SiPc-NO 溶液,用 THF 稀释至 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后,移取 3 mL 于石英比色皿中,使用功率密度为 $500 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 680 nm 激光器照射,分别在 0、10、20、30、40、60、90、120、180、240、300、420 和 540 s 进行紫外吸收光谱测定^[22]。

2.7 NO-SiPc-NO@NPs 的光动力效果

取对数生长期的 MCF-7 和 HeLa 细胞,分别以每孔 1.3×10^4 个和 1.0×10^4 个接种至 96 孔板中, 37°C 、体积分数 5% CO_2 条件下培养 24 h 后,弃去原培养液基,加入含 NO-SiPc-NO@NPs 的培养基(以 NO-SiPc-NO 计,摩尔浓度分别为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),每孔 100 μL 。另设光照组,所有条件都一样,给药 2 h 后,用 680 nm 激光器照射每孔 1.5 min。培养 48 h 后,弃去原培养基,每孔用 100 μL PBS 洗 3 遍,再加入 100 μL 含有 10% CCK-8 的培养基,继续培养 1 h,采用酶标仪在 450 nm 波长处测定 A 值,并根据公式 3 计算细胞存活率^[23]。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白调零组}}}{A_{\text{空白组}} - A_{\text{空白调零组}}} \times 100\% \quad \text{公式(3)}$$

2.8 NO-SiPc-NO@NPs 的体外 NO 检测

使用 NO 荧光探针(DAF FM DA)评估细胞内 NO 的产生^[24]。将人乳腺癌 MCF-7 细胞每孔 7×10^4 个种于 24 孔板中,在 37°C 的细胞培养箱培养 24 h。待细胞贴壁后,弃去旧培养基后,加入 NO-SiPc-NO@NPs 无血清细胞培养液,在 37°C 细胞培养箱中孵育 5 h。

弃去上清,用 PBS 洗 3 次,加入提前配置好的入 DAF-FM DA($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 荧光探针溶液, 37°C 下孵育 30 min。用 PBS 洗涤 3 次,并用 DAPI 染核,最后使用荧光倒置显微镜观察在 515 nm 处的荧光情况。

3 结果

3.1 NO-SiPc-NO 偶联物的结构表征

得到蓝绿色固体(0.199 mg, 0.130 mmol), 产率:40%。

3.1.1 $^1\text{H-NMR}$ 分析 NO-SiPc-NO 的 $^1\text{H-NMR}$ 信息如下: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.70 (dp, $J=6.6, 3.7, 3.2 \text{ Hz}, 8\text{H}$), 8.54 (dt, $J=5.8, 3.3 \text{ Hz}, 8\text{H}$), 7.99 ~ 7.95 (m, 4H), 7.82 (tt, $J=7.2, 1.3 \text{ Hz}, 2\text{H}$), 7.67 (t, $J=8.0 \text{ Hz}, 4\text{H}$), 4.29 (t, $J=6.2 \text{ Hz}, 4\text{H}$), 3.97 (t, $J=6.3 \text{ Hz}, 4\text{H}$), 1.97 (dt, $J=20.2, 6.5 \text{ Hz}, 4\text{H}$), 1.89 (t, $J=20.2, 6.5 \text{ Hz}, 4\text{H}$), 1.17 (t, $J=7.3 \text{ Hz}, 4\text{H}$), 0.42 (t, $J=6.4 \text{ Hz}, 4\text{H}$), -0.27 (t, $J=6.0 \text{ Hz}, 4\text{H}$)。

NO-SiPc-NO 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图见图 2。其中 δ 9.70 和 8.54 为硅酞菁的质子峰,共 8 个氢。 δ 7.99 ~ 7.95, 7.82, 7.67 的 8 个质子峰为 2 个 NO 供体苯环上的氢。NO-SiPc-NO 中与硅元素相近的 4 个氢原子化学位移值为负值,其余为亚甲基上的质子峰。

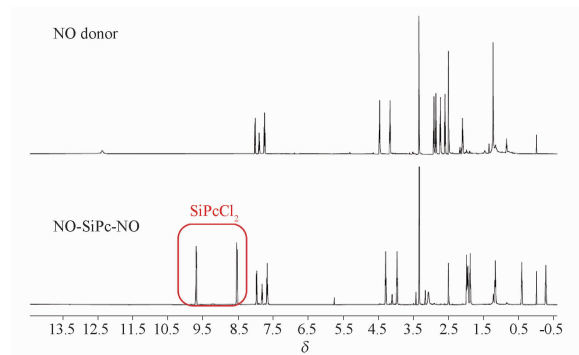


图 2 一氧化氮(NO)供体与 NO-SiPc-NO 的核磁共振氢谱图
Fig.2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of NO donor and NO-SiPc-NO

3.1.2 IR 分析

NO-SiPc-NO 的 IR 信息如下:
FT-IR (ATR) ν (cm^{-1}): 1 733、1 550、1 334、1 079、685。

NO-SiPc-NO 结构中主要的特征基团有酯键、呋喃环、磺酰基和二硫键,结果中,1 733 cm^{-1} 为酯羰基振动峰,1 079 cm^{-1} 为酯 C—O 振动峰,1 550 cm^{-1} 为呋喃环拉伸振动峰,1 334 cm^{-1} 为磺酰基的拉伸振动峰,685 cm^{-1} 为二硫键的拉伸

振动峰。随着之间的形成,NO-SiPc-NO 中 NO 供体在 $3\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 左右的 $-\text{COOH}$ 特征峰消失(图 3)。

3.2 NO-SiPc-NO 的含量测定

专属性实验结果见图 4A,表明空白溶剂不干扰 NO-SiPc-NO 的测定,NO-SiPc-NO 方法的专属性良好。以峰面积(A)对 NO-SiPc-NO 质量浓度(ρ)进行线性回归,结果见图 4B。结果表明,NO-SiPc-NO 在 $1 \sim 40\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性良好,相关系数大于 0.999。低、中、高浓度 NO-SiPc-NO 的日内精密度 RSD 分别为 1.01%、1.51%、1.88%,日间精密度 RSD 分别为 0.87%、1.15%、1.13%,均小于 2.00% ($n = 3$),说明方法的精密度良好。

低、中、高浓度 NO-SiPc-NO 对应的加样回收率 ($n = 3$) 分别为 $(99.67 \pm 1.01)\%$ ($98.35 \pm 1.51)\%$ 和 $(104.39 \pm 1.88)\%$,RSD 小于 2%,表明方法的准确度较好。

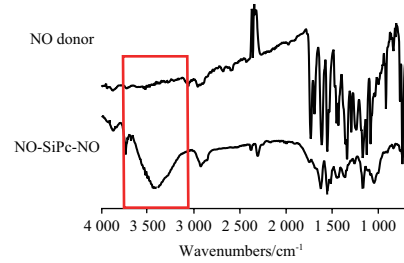
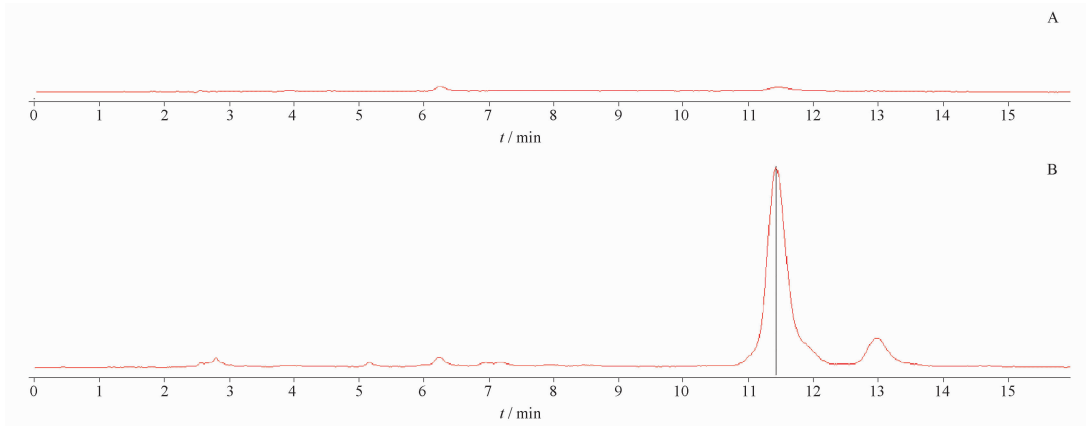


图 3 NO 供体与 NO-SiPc-NO 的红外光谱图
Fig. 3 IR spectra of NO donor and NO-SiPc-NO



A - 空白溶剂;B - NO-SiPc-NO。
A - blank solvent;B - NO-SiPc-NO.

图 4 NO-SiPc-NO 的高效液相色谱(HPLC)专属性色谱图
Fig. 4 HPLC specificity spectrum of NO-SiPc-NO

3.3 单因素考察

3.3.1 NO-SiPc-NO 浓度的选择 选择 NO-SiPc-NO 偶联物质量浓度为 $2.5\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,测得的粒径、PDI 和 Zeta 电位分别为 $(151.433 \pm 1.985)\ \text{nm}$,

(0.115 ± 0.029) 和 $(-15.6 \pm 1.951)\ \text{mV}$ (图 5)。PDI 和电位比制备质量浓度为 1.0、1.5、2.0 及 $3.0\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时的更小,因此选择 $2.5\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为 NO-SiPc-NO@NPs 的制备浓度。

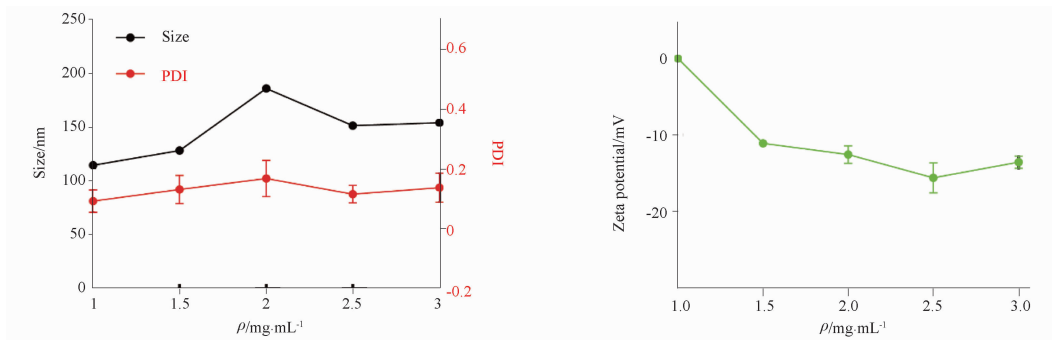


图 5 不同的 NO-SiPc-NO 浓度对自组装纳米粒的粒径、多分散系数(PDI)和 Zeta 电位的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$
Fig. 5 Effects of different NO-SiPc-NO concentrations on particle size, PDI and Zeta potential of NO-SiPc-NO@NPs. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3.3.2 搅拌速度的选择 当水相以 $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度搅拌时,所制备的 NO-SiPc-NO@ NPs 的 PDI ($0.097 \pm 0.913\ 5$), Zeta 电位 ($-14.4 \pm 0.077\ 3$) mV, 与其他组相比最小。因此,选择 $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 为制备 NO-SiPc-NO@ NPs 的搅拌速度(图 6)。

3.3.3 稳定剂 DSPE-PEG_{2K} 含量的选择 结果显

示,稳定剂 DSPE-PEG_{2K} 含量为 40% 时,纳米粒的粒径与 PDI 更小,因此,选择含 40% 作为最佳稳定剂含量(图 7)。

3.3.4 有机相水相体积比的选择 结果显示,有机相与水相体积比为 1:3 时,纳米粒的粒径与 PDI 更小,因此,选择 1:3 为最佳体积比(图 8)。

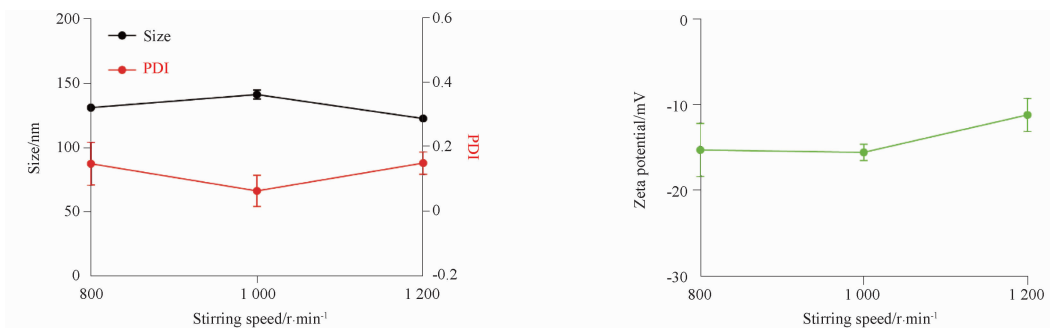


图 6 不同搅拌速度对 NO-SiPc-NO@ NPs 的粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 Effects of different stirring speeds on particle size, PDI and Zeta potential of NO-SiPc-NO@ NPs. $n = 3, \bar{x} \pm s$

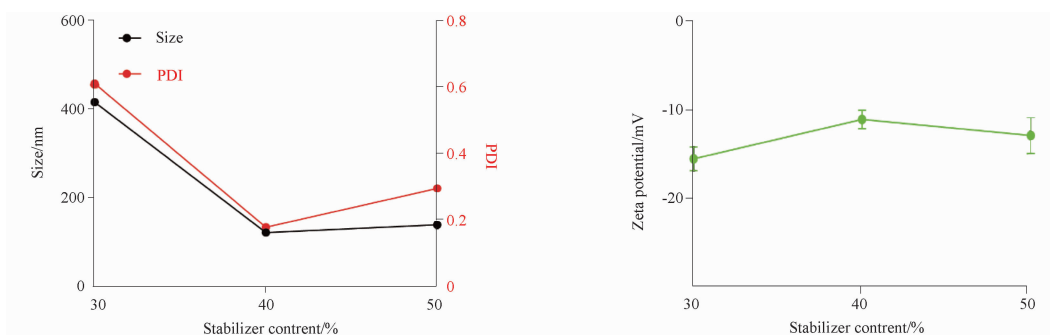


图 7 不同含量的稳定剂对 NO-SiPc-NO@ NPs 的粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 7 Effects of different levels of stabilisers on particle size, PDI and Zeta potential of NO-SiPc-NO@ NPs. $n = 3, \bar{x} \pm s$

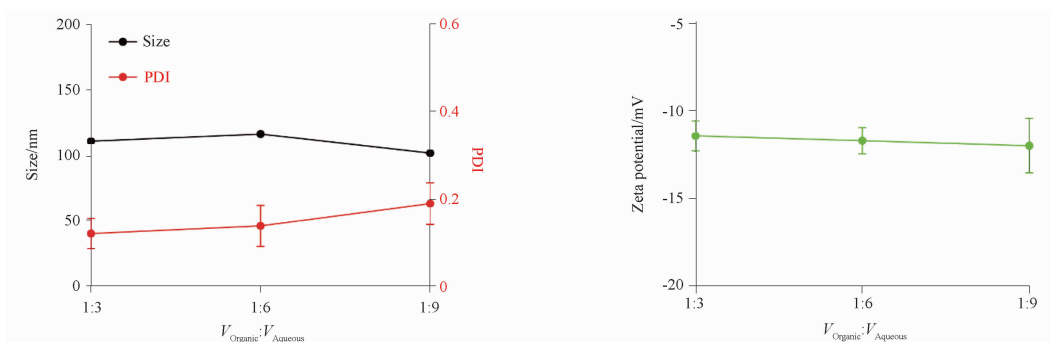


图 8 不同有机相与水相体积比对 NO-SiPc-NO@ NPs 的粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 8 Effects of different organic to aqueous phase volume ratios on particle size, PDI and Zeta potential of NO-SiPc-NO@ NPs. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3.4 NO-SiPc-NO@ NPs 的表征

3.4.1 外观及微观形态表征 制备的 NO-SiPc-NO@ NPs 见图 9A, 溶液呈蓝色乳光。NO-SiPc-NO@ NPs 的 TEM 结果见图 9B, NO-SiPc-NO@ NPs 表面呈现为光滑的球形或类球形, 其颗粒尺寸分布相对均

匀, 而且粒径大小均为 100 nm 左右。

3.4.2 NO-SiPc-NO 包封率和载药量的测定 采用高效液相色谱法测得 NO-SiPc-NO 包封率达 80%, 载药量高达 60% 以上, 为 NO 的有效传递和光动力疗法奠定了坚实的基础。

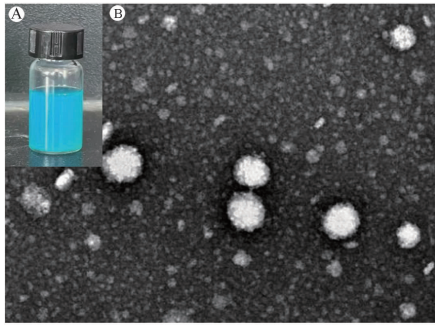


图9 按照最佳工艺制备的纳米粒表征结果外观(A)和透射电镜(TEM)图(B)(×300)

Fig. 9 Characterization results of NPs prepared according to optimal prescription appearances(A) and TEM result(B)(×300)

3.4.3 NO-SiPc-NO@ NPs 的稳定性 稳定性实验结果见图 10, 在室温和 4 °C 的贮存条件下, 经过 30 d, NO-SiPc-NO 自组装纳米粒的粒径及 PDI 略有

上升, 但变化不显著, 电位、NO-SiPc-NO 包封率与载药量在 30 d 内几乎未发生变化, 说明纳米粒稳定性良好。

3.4.4 NO-SiPc-NO@ NPs 的解聚情况 结果见图 11, 当 pH 值 6.8 时, 在 12 h 时, NO-SiPc-NO@ NPs 持续快速解聚达到将近 50%。随后, NO-SiPc-NO@ NPs 缓慢解聚, 在 48 h 时, NO-SiPc-NO 的累计解聚度为 $(58.71 \pm 0.57)\%$ 。而在 pH 5.0 的磷酸盐缓冲溶液中, 虽然药物的解聚趋势基本一致, 但累计解聚度高达 $(81.34 \pm 3.00)\%$ 。自组装纳米粒在两种 pH 磷酸盐缓冲溶液中均显示出了缓释效果, 并在 pH 6.8 的 PBS 溶液里的 48 h 累计解聚度比在 pH 5.0 的磷酸盐缓冲溶液里的小, 说明纳米粒具有肿瘤微环境响应性。根据表 1 解聚动力学模型模拟结果可知, NO-SiPc-NO 的解聚遵循一级动力学模型。

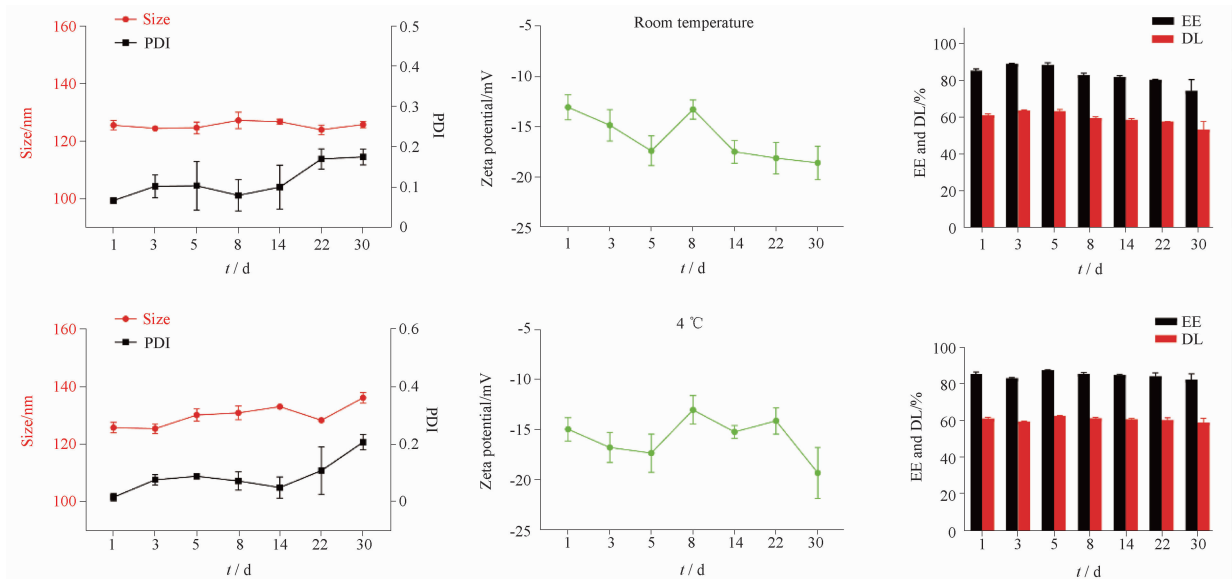


图 10 NO-SiPc-NO@ NPs 在室温和 4 °C 的初步稳定性实验结果。n = 3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 10 Preliminary stability of NO-SiPc-NO@ NPs at room temperature and 4 °C. n = 3, $\bar{x} \pm s$

表 1 NO-SiPc-NO 体外解聚动力学模型

Tab. 1 Kinetic modeling of NO-SiPc-NO depolymerization *in vitro*

Model release medium	Zero-order		First-order		Higuchi model	
	Equation	r	Equation	r	Equation	r
pH 6.8	$Q = 30.5025 + 0.7083t$	0.3124	$Q = 113.52(1 - e^{-0.8087t})$	0.9357	$Q = 6.5522t^{1/2} + 20.7068$	0.6058
pH 5.0	$Q = 37.36 + 1.1857t$	0.4261	$Q = 73.42(1 - e^{-0.37t})$	0.9580	$Q = 10.8433t^{1/2} + 19.6197$	0.8001

3.5 NO-SiPc-NO@ NPs 的性质评价

3.5.1 NO 释放实验 用 Griess 法检测 NO-SiPc-NO 和 NO-SiPc-NO@ NPs 的 NO 释放。亚硝酸钠的回归方程为 $A = 0.007C + 0.0517 (r^2 = 0.9997)$ 。NO 释放结果见图 12, 在 3 h 时, NO-SiPc-NO 和 NO-SiPc-NO@

NPs 的释放分别为 99% 和 73% 左右, 之后呈现缓释特征。在 4 h 内, 游离的 NO-SiPc-NO 能 100% 释放 NO, 而剂型组只能释放 80% 左右。可能原因是纳米粒使得药物更加紧密, 在 NO 释放过程中需先克服纳米载体表层的阻碍, 故而释放速率缓慢。

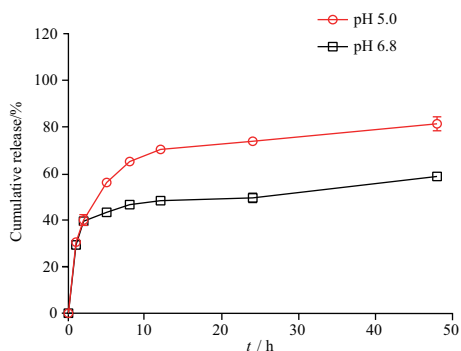


图 11 NO-SiPc-NO@ NPs 在不同介质中的累计解聚度。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 11 Accumulative depolymerization degree of NO-SiPc-NO@ NPs in different media. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3.5.2 ROS 测定 结果见图 13, 向 DPBF 溶液中分别加入 NO-SiPc-NO 和 NO-SiPc-NO@ NPs 时, DPBF

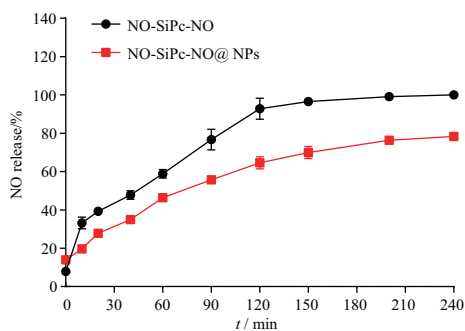
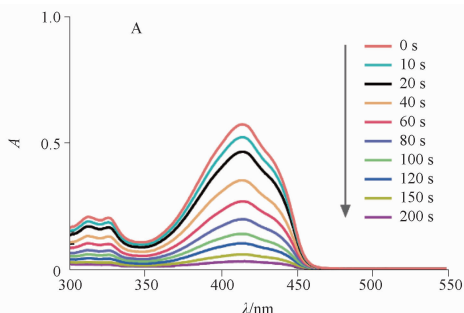


图 12 NO 体外释放实验结果。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 12 Results of NO *in vitro* release experiment. $n = 3, \bar{x} \pm s$

荧光探针在 415 nm 处的吸光度显著下降, 这说明所合成的 NO-SiPc-NO 和制备的 NO-SiPc-NO@ NPs 在激光 ($680 \text{ nm}, 500 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) 照射下均可以有效地产生 ROS。

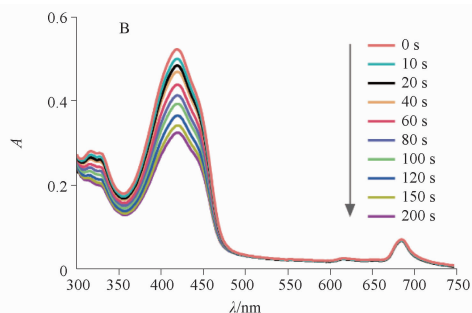


图 13 NO-SiPc-NO(A) 和 NO-SiPc-NO@ NPs(B) 的活性氧测定

Fig. 13 Reactive oxygen determination of NO-SiPc-NO(A) and NO-SiPc-NO@ NPs(B)

3.5.3 NO-SiPc-NO 的光稳定性 通过测定 NO-SiPc-NO 在不同光照时间下的吸收光谱来分析其光稳定性, 见图 14。采用 NO-SiPc-NO 的最大波长范围内的 680 nm 的红光照射下, NO-SiPc-NO 的吸收光谱并没有发生明显的变化。因此, 在光照条件下, NO-SiPc-NO 的光稳定性良好。

3.6 NO-SiPc-NO@ NPs 的光动力效果

采用 Graph Pad Prism 10.0 软件进行统计分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 各光照组与不光照组进行方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。在光照和没有光照下对人癌细胞生长抑制情况列于图 15。没有光照下, NO-SiPc-NO@ NPs 对 MCF-7 和 HeLa 细胞的生长基本没有影响, 说明该药物基本没有暗毒性。而在光照下 ($\lambda = 680 \text{ nm}$, 光功率密度为 $500 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$), NO-SiPc-NO@ NPs 显示了对 MCF-7 和 HeLa 细胞生长明显的抑制作用, 当浓度为 $6.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 可完全抑制 MCF-7 和 HeLa 细胞的生长。从量效曲线计算得出纳米粒的 IC_{50} 值分别为 0.6394 和 $1.364 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 极低的 IC_{50} 值说明 NO-SiPc-NO@ NPs 具有极高的光动力抗癌活性, 并且 MCF-7 乳腺癌细胞对 NO-SiPc-NO@ NPs 更敏感。

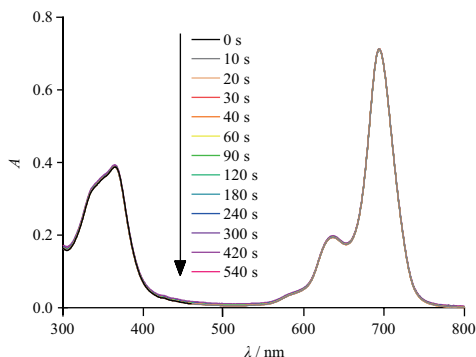
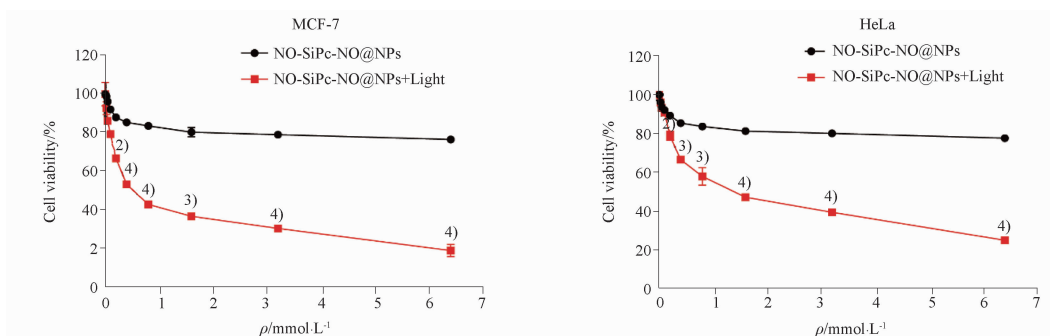


图 14 NO-SiPc-NO 的光稳定性测试

Fig. 14 Photostability test of NO-SiPc-NO

3.7 NO-SiPc-NO@ NPs 的胞内 NO 释放

氧化咪唑类 NO 供体是一种巯基依赖性的杂环



与 SiPc-NO@NPs 相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$, ⁴⁾ $P < 0.0001$ 。
¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$, ⁴⁾ $P < 0.0001$, compared with SiPc-NO@NPs.

图 15 NO-SiPc-NO@NPs 对 MCF-7 和 HeLa 细胞增殖活力的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 15 Effect of NO-SiPc-NO@NPs on proliferative viability of MCF-7 and HeLa cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

类 NO 供体, 它的衍生物如嘧啶并氧化呋咱、苯并氧化呋咱同样具有 NO 供体性质。前期实验已验证 NO-SiPc-NO 和 NO-SiPc-NO@NPs 在溶液中能有效地产生 NO, 但胞内的 NO 释放需要进一步检验。DAF-FM DA 是一种新型荧光探针, 其可透过细胞膜进入细胞内并在与细胞内酯酶作用下迅速转化为无法穿透细胞膜的 DAF-FM, 被广泛应用于 NO 检测领域。DAF-FM 荧光极为微弱, 但在与 NO 反应后可

显著增强产生强烈荧光信号, 具有较高的灵敏性, 激发波长为 495 nm, 发射波长为 515 nm。

由于 MCF-7 乳腺癌细胞对 NO-SiPc-NO@NPs 更敏感, 并且酞菁硅光敏剂在乳腺癌治疗应用较多, 因此只进行 MCF-7 细胞的 NO 释放实验。实验结果见图 16, 经 NO-SiPc-NO@NPs 的诱导, 实验组细胞内出现绿色荧光, 表明 NO 水平明显升高, NO-SiPc-NO@NPs 能有效产生 NO。

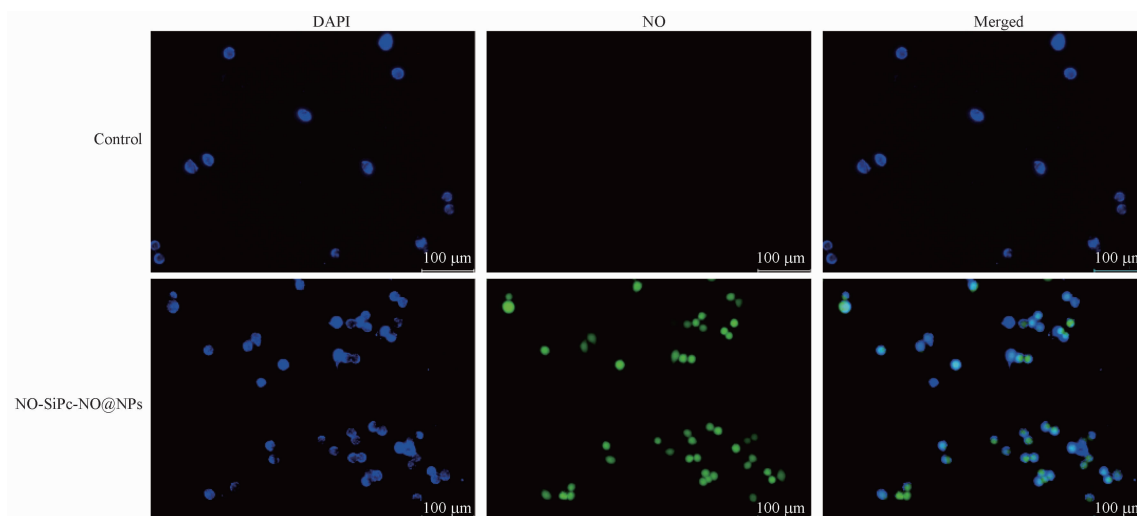


图 16 NO-SiPc-NO@NPs 影响 MCF-7 细胞中 NO 含量

Fig. 16 NO-SiPc-NO@NPs affect NO content in MCF-7 cells

4 讨论

本实验通过合成反应初次制备了呋咱类 NO 供体-光敏剂硅酞菁偶联物 NO-SiPc-NO, 并通过 FT-IR 和 NMR 确定其结构, 采用纳米沉淀法制备了 NO-SiPc-NO 自组装纳米粒, 筛选纳米粒制备的最优条件。NO-SiPc-NO 质量浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、转速为 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、有机相与水相体积比为 1:3 和

稳定剂含量为 40% 时, 能制备出粒径、PDI 和 Zeta 电位最小的自组装纳米粒。通过电子显微镜, 可以得出纳米粒形态圆整, 呈近球形, 粒径小于水中观察到的平均尺寸, 可能原因是纳米颗粒会在水中膨胀。NO-SiPc-NO 包封率和载药量可高达 80% 和 60%, 与传统的递送系统脂质体相比高出十几倍, 可以实现 NO 的有效递送。

本研究考察了 NO-SiPc-NO 的光学特性,结果显示,NO-SiPc-NO 在体外能产生 ROS,并具有良好的光稳定性。NO 供体的引入,提高酞菁硅的光动力学活性,并使其具备释放 NO 的能力。通过 NO-SiPc-NO 的体外 NO 释放实验结果可知,游离 NO-SiPc-NO 和 NO-SiPc-NO@ NPs 都能在模拟的肿瘤环境内完全释放 NO。另外,本研究还比较了 NO-SiPc-NO@ NPs 对 MCF-7 乳腺癌细胞和 HeLa 宫颈癌细胞的光毒性。在不光照的条件下,纳米粒对两种细胞都没有细胞毒性,而在光照条件下的 IC₅₀ 值分别为 0.639 4 和 1.364 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,表明 MCF-7 乳腺癌细胞对 NO-SiPc-NO@ NPs 更敏感,后续将通过动物实验进一步验证 NO-SiPc-NO@ NPs 在体内对乳腺癌的安全性和靶向性,以探究该纳米粒设计的有效性。

综上所述,本研究成功制备了 NO-SiPc-NO@ NP,其粒径大小均一、分布均匀,并具有良好的光动力学活性。

REFERENCES

- [1] ZHANG Y, NG D K P, FONG W P. Antitumor immunity induced by the photodynamic action of BAM-SiPc, a silicon(IV) phthalocyanine photosensitizer[J]. *Cell Mole Immunol*, 2019, 16(7):676-678.
- [2] MITRA K, HARTMAN M C T. Silicon phthalocyanines: synthesis and resurgent applications[J]. *Org Biomol Chem*, 2021, 19(6):1168-1190.
- [3] SCHMIDT A M, CALVETE M J F. Phthalocyanines: an old dog can still have new (photo) tricks! [J] *Molecules*, 2021, 26(9):2823-2844.
- [4] LI D, CAI S, WANG P, et al. Innovative design strategies advance biomedical applications of phthalocyanines [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(22):2300263-2300286.
- [5] CAROBELI L R, MEIRELLES L E D F, Damke G M Z F, et al. Phthalocyanine and its formulations: a promising photosensitizer for cervical cancer phototherapy[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(12):2057-2084.
- [6] SANTOS K L M, BARROS R M, DA SILVA LIMA D P, et al. Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: a mini-review [J]. *Photodiagn Photodyn Ther*, 2020, 32:102032-102069.
- [7] LO P C, RODRIGUEZ-MORGADE M S, PANDEY R K, et al. The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitizers for photodynamic therapy of cancer [J]. *Chem Soc Rev*, 2020, 49(4):1041-1056.
- [8] BONAVIDA B. Sensitizing activities of nitric oxide donors for cancer resistance to anticancer therapeutic drugs[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 176:113913-113919.
- [9] KIM J, YUNG B C, KIM W J, et al. Combination of nitric oxide and drug delivery systems; tools for overcoming drug resistance in chemotherapy[J]. *J Controlled Release*, 2017, 263:223-230.
- [10] SUNG Y C, JIN P R, CHU L A, et al. Delivery of nitric oxide with a nanocarrier promotes tumour vessel normalization and potentiates anti-cancer therapies[J]. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14(12):1160-1169.
- [11] YIN M, TAN S, BAO Y, et al. Enhanced tumor therapy via drug co-delivery and in situ vascular-promoting strategy [J]. *J Controlled Release*, 2017, 258:108-120.
- [12] FAN Y, LIU Y, WU Y, et al. Natural polysaccharides based self-assembled nanoparticles for biomedical applications-A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 192:1240-1255.
- [13] LI D, ZHANG R, LIU G, et al. Redox-responsive self-assembled nanoparticles for cancer therapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9(20):2000605-2000621.
- [14] ZHAO Z, SHAN X, ZHANG H, et al. Nitric oxide-driven nanotherapeutics for cancer treatment [J]. *J Controlled Release*, 2023, 362:151-169.
- [15] GE W, SI W L, DONG X C. Research progress of self-assembled nanoparticles in cancer diagnosis and treatment[J]. *J Nanjing Univ Technol*(南京工业大学学报), 2021, 43(1):1-12.
- [16] WANG Z, CHEN J, LITTLE N, et al. Self-assembling prodrug nanotherapeutics for synergistic tumor targeted drug delivery[J]. *Acta Biomater*, 2020, 111:20-28.
- [17] XU L, ZHANG T, HUANG B, et al. Chlorophenyl thiophene silicon phthalocyanine: Synthesis, two-photon bioimaging-guided lysosome target, and *in vitro* photodynamic efficacy [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1168393-1168401.
- [18] CHEN X, MOONSHI S S, NGUYEN N T, et al. Preparation of protein-loaded nanoparticles based on poly(succinimide)-oleylamine for sustained protein release: a two-step nanoprecipitation method[J]. *Nanotechnology*, 2024, 35(5):055101-055113.
- [19] ZHAO Y, SHI D, GUO L, et al. Ultrasound targeted microbubble destruction-triggered nitric oxide release via nanoscale ultrasound contrast agent for sensitizing chemioimmunotherapy[J]. *J Nanobiotechnol*, 2023, 21(1):35-51.
- [20] GIROTTI A W, FAHEY J M. Upregulation of pro-tumor nitric oxide by anti-tumor photodynamic therapy[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 176:113750-113768.
- [21] ZHENG N, XIE D, WANG C, et al. Water-soluble, zwitterionic poly-photosensitizers as carrier-free, photosensitizer-self-delivery system for *in vivo* photodynamic therapy[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(47):44007-44017.
- [22] LI S. Construction of hydroxyethyl starch-porphyrin E 6 nanoparticles and study on its photodynamic antitumor activity[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2021.
- [23] HAFIZ I, LI Z, WANG Z, et al. Exploring the mechanism of Peganum harmala L. seeds on hepatocellular carcinoma based on network pharmacology and molecular docking[J]. *J Chin Pharm Sci*(中国药学 英文版), 2022, 31(7):517-529.
- [24] HUYSSSEUNE A, LARSEN U G, LARIONOVA D, et al. Bone formation in zebrafish: the significance of DAF-FM DA staining for nitric oxide detection [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(12):1780-1793.

(收稿日期:2024-04-18)