

# 转铁蛋白修饰的载新吲哚菁绿脂质体的制备及其对乳腺癌光动力治疗作用研究

卢雪<sup>1</sup>, 张书贺<sup>1</sup>, 赵艺涵<sup>1</sup>, 金明姬<sup>2</sup>, 高钟镐<sup>2\*</sup>, 金光明<sup>1\*</sup> (1. 延边大学附属医院超声医学科, 吉林 延吉 133000; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:**目的 制备转铁蛋白(Tf)修饰的载光敏剂新吲哚菁绿(IR820)脂质体,并对其进行表征,结合光动力治疗(PDT)乳腺癌4T1细胞及原位乳腺癌小鼠模型,为临床治疗乳腺癌提供一种新思路。方法 采用薄膜分散法分别制备载IR820脂质体(IR820@Lipo)和Tf修饰的载IR820脂质体(Tf-IR820@Lipo),采用紫外(UV)法检测其包封率,用透射电子显微镜和粒径仪考察其理化性质;以激光共聚焦和流式细胞技术观察4T1细胞对两者的摄取情况;CCK8实验评价两者对4T1细胞的增殖抑制;活性氧(ROS)检测在激光(Laser)照射下两者细胞内荧光强度差异;体内小动物成像法观察药物在模型小鼠内的聚集情况;体内药理学研究分析药物抗癌作用及毒副作用。结果 IR820@Lipo和Tf-IR820@Lipo平均粒径分别为(84.30±15.66)、(116.20±14.68)nm,电位分别为(-8.21±2.06)、(-5.23±1.19)mV;透射电镜表征显示该脂质体呈类球形,分布均匀;IR820@Lipo的包封率为(94.61±0.67)%,载药量为(8.82±0.92)%;Tf-IR820@Lipo的包封率为(95.55±0.83)%,载药量为(8.92±1.01)%。Tf-IR820@Lipo在Laser照射下能显著抑制4T1细胞的增殖并促进其凋亡;ROS检测结果显示Tf-IR820@Lipo在Laser照射下能使4T1细胞内荧光强度明显增强;荷瘤小鼠的体内实验结果显示,Tf-IR820@Lipo光照组在小鼠体内具有较高的肿瘤靶向性;体内药理学研究显示Tf-IR820@Lipo对乳腺癌的抑制作用最强,且未造成小鼠的肝肾功能损伤,无明显的毒副作用。结论 Tf-IR820@Lipo以其高靶向性、高疗效及低毒性有望成为治疗乳腺癌的新型制剂。

**关键词:**转铁蛋白光敏性脂质体;光动力疗法;乳腺癌;新吲哚菁绿

doi:10.11669/cpj.2024.11.009 中图分类号:R944.9 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)11-1023-09

## Preparation of Transferrin Modified IR820 Targeting Liposomes and Its Effect on Photodynamic Therapy of Breast Cancer

LU Xue<sup>1</sup>, ZHANG Shuhe<sup>1</sup>, ZHAO Yihan<sup>1</sup>, JIN Mingji<sup>2</sup>, GAO Zhonggao<sup>2\*</sup>, JIN Guangming<sup>1\*</sup> (1. Department of Ultrasound, Yanbian University Hospital, Yanji 133000, China; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Functions of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulations, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare and characterize transferrin (Tf) modified liposomes containing photosensitizing agent indocyanine green (IR820), and to provide a new idea for the clinical treatment of breast cancer by combining photodynamic therapy (PDT) in 4T1 breast cancer cells and the mouse model of breast cancer *in situ*. **METHODS** The liposome loaded with IR820 (IR820@Lipo) and the Tf modified liposome loaded with IR820 (Tf-IR820@Lipo) were prepared by the film dispersion method, respectively. The encapsulation efficiency was detected by UV method, and the physical and chemical properties were investigated by transmission electron microscope and particle size meter. CCK8 assay was used to evaluate the inhibitory effect of the two drugs on the proliferation of 4T1 cells. The intracellular fluorescence intensity of the two drugs under laser irradiation was detected by reactive oxygen species (ROS). *In vivo* pharmacodynamic study was performed to analyze the anticancer effect and toxic side effects of drugs. **RESULTS** The average particle size of IR820@Lipo and Tf-IR820@Lipo were (84.30±15.66) and (116.20±14.68) nm, respectively, and the Zeta potential were (-8.21±2.06) and (-5.23±1.19) mV, respectively. Transmission electron microscopy showed that the liposome was spherical and uniformly distributed. The encapsulation efficiency of IR820@Lipo was (94.61±0.67)%, and the drug loading was (8.82±0.92)%. The encapsulation efficiency of Tf-IR820@Lipo was (95.55±0.83)%, and the drug loading was (8.92±1.01)%. Tf-IR820@Lipo could significantly inhibit the proliferation and promote the apoptosis of 4T1 cells under laser irradiation. ROS detection results showed that Tf-IR820@Lipo could significantly

**基金项目:**吉林省自然科学基金面上项目资助(YDZJ202201ZYTS204)

**作者简介:**卢雪,女,硕士 研究方向:超声结合靶向抗癌药物治疗 \*通讯作者:高钟镐,男,博士,教授 研究方向:靶向纳米给药系统的研究 Tel:(010)63028096;金光明,男,博士,副教授 研究方向:超声结合靶向抗癌药物治疗 Tel:(0433)2660056

enhance the fluorescence intensity of 4T1 cells under laser irradiation. The results of *in vivo* experiments in tumor-bearing mice showed that the Tf-IR820@ Lipo light groups had higher tumor targeting in mice. The pharmacodynamic study *in vivo* showed that Tf-IR820@ Lipo had the strongest inhibitory effect on breast cancer, and did not cause liver and kidney function damage in mice, and had no obvious toxic side effects. **CONCLUSION** Tf-IR820@ Lipo is expected to become a new agent for the treatment of breast cancer due to its high targeting, high efficacy and low toxicity.

**KEY WORDS:** transferrin photosensitive liposome; photodynamic therapy; breast cancer; indocyanine green(IR820)

根据国家癌症中心最新公布的调查结果显示,乳腺癌仍是女性发病率最高的癌症<sup>[1]</sup>。由于我国人口基数大,导致乳腺癌发病人数及死亡人数均居世界首位<sup>[2]</sup>。现阶段我国对乳腺癌的治疗已形成包括传统放疗、靶向治疗、内分泌免疫治疗及新兴的“精准治疗”等不同体系<sup>[3-5]</sup>。然而,由于患者认知程度的不同及各地医疗水平的差异,导致乳腺癌患者的死亡率仍处于一个较高的水平。因此,进一步提升化疗药物的靶向性、提高药物疗效仍是药物研发的主要目标和热点。

有研究发现转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)在白血病、肺癌、肝癌及乳腺癌细胞上的表达要明显高于正常细胞<sup>[6-8]</sup>,根据这个现象有学者尝试将转铁蛋白(Tf)修饰到抗癌制剂上,通过Tf和TfR特异性结合,使抗癌制剂直接作用于肿瘤细胞,以提升其靶向性<sup>[9]</sup>。根据本课题组的前期研究显示,Tf修饰的多西他赛纳米粒对非小细胞肺癌的靶向性有了较为明显的提升<sup>[10-11]</sup>。在本实验中,首先制备载新吡啶菁绿(IR820)脂质体(IR820@ Lipo)和Tf修饰的载IR820脂质体(Tf-IR820@ Lipo)的光敏脂质体并对其进行表征,结合光动力治疗(PDT)乳腺癌4T1细胞及原位乳腺癌小鼠模型,为临床治疗乳腺癌提供一种新思路。

## 1 材料

### 1.1 药品、试剂与细胞株

IR820(百灵威科技有限公司);1,2-二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,上海艾伟拓医药科技有限公司);胆固醇(CHOL,百灵威科技有限公司);二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000,国药集团化学试剂有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS,国药集团化学试剂有限公司);聚山梨酯80(北京索莱宝科技有限公司),所用有机溶剂均为分析纯。乳腺癌细胞(4T1)取自中国医学科学院基础研究所细胞中心。培养基成分为体积分数10%胎牛血清(FBS)、质量分数1%谷氨酰胺的RPMI-1640及质量分数1%的青霉素-链霉素双抗。培养条件为体

积分数5% CO<sub>2</sub>,温度37℃,当细胞处于对数生长期时进行实验。

### 1.2 主要仪器

AL204型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);MS3型磁力搅拌器、MS3型恒温磁力搅拌器(德国IKA公司);Alpha 1-2/LD-Plus型冷冻干燥机(德国Christ公司);Mercury-600型核磁共振仪(美国瓦里安公司);Nicolet 5700型傅里叶红外光谱(美国Thermo公司);R-215V型旋转蒸发器(瑞士BUCHI公司);DLSB-5/10型低温冷却循环泵(郑州长城科工贸有限公司);超声细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);Malvern Nano ZS90型马尔文激光粒度分析仪(英国Malvern公司);JEM1400PLUS型透射电子显微镜(德国徕卡公司);ZD-85A型气浴恒温振荡器(北京赛伯乐实验仪器有限公司);Synergy H1型微孔板多功能全波长酶标仪(美国BioTek公司);TU-1810型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);TD5Z型台式高速离心机(中国凯特实验仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 载体材料的合成

称取11.915g 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPEs)溶解于40 mL蒸馏水中,加入0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH调节pH值至8.0,用蒸馏水定容至50 mL,置于4℃冰箱保存备用。将8.7 mg DSPE-PEG2000-Mal溶解在5 mL HEPEs缓冲液中,加入23 mg Tf,在氮气保护下,室温搅拌反应24 h,最后将未反应的产物利用透析法除去,透析液冷冻干燥后得到纯化的DSPE-PEG2000-Tf。

### 2.2 Tf修饰脂质体的制备

采用薄膜分散法制备脂质体。称取DPPC 8 mg、CHOL 7 mg、DSPE-PEG2000 4 mg及IR820 1 mg溶于3 mL三氯甲烷中。超声溶解后,在40℃水浴下旋蒸30 min除去三氯甲烷,使药物在器壁上形成一层均匀的薄膜。加入2 mL PBS至薄膜上水化1 h,随后冰水浴探头超声10 min(功率65 W,超

声 2 s, 间歇 2 s) 得到 IR820@Lipo。

称取 DPPC 8 mg、CHOL 7 mg、DSPE-PEG2000 2 mg、DSPE-PEG2000-Tf 2 mg 及 IR820 1 mg 溶于 3 mL 三氯甲烷中。超声溶解后, 在 40 °C 水浴下旋蒸 30 min 除去三氯甲烷, 使药物在器壁上形成一层均匀的薄膜。加入 2 mL PBS 至薄膜上水化 1 h, 随后冰水浴探头超声 10 min (功率 65 W, 超声 2 s, 间歇 2 s) 得到 Tf-IR820@Lipo。

### 2.3 Tf 修饰脂质体剂粒径、电位及包封率的测定

IR820@Lipo 和 Tf-IR820@Lipo 脂质体用水稀释后利用 Malvern Nano ZS 激光粒度分析仪测定其粒径及电位。采用超滤法测定 IR820 的包封率。取适量 Tf-IR820@Lipo 溶液, 放入超滤离心管中截留分子质量 (MWCO) = 30 000, 15 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 30 min, 取适量下滤液, 加入甲醇稀释, 得出下滤液中的游离药量  $M_1$ 。另取等量的 Tf-IR820@Lipo 溶液直接加入甲醇稀释破坏后, 同法测定溶液中 IR820 的总量  $M_0$ , 计算包封率。

### 2.4 Tf-IR820@Lipo 稳定性考察

为了考察脂质体的储存稳定性, 将制备好的 IR820@Lipo 和 Tf-IR820@Lipo 溶液于 4 °C 放置 7 d, 观察脂质体溶液的颜色及透明度等指标, 测定脂质体的粒径、Zeta 电位和多分散系数 (PDI), 记录其随时间的变化情况。

### 2.5 Tf-IR820@Lipo 体外药物释放

采用透析法对 Tf-IR820@Lipo 体外释放药物特性进行考察, 将 Tf-IR820@Lipo 用磷酸盐缓冲液溶解后加入透析袋 (MWCO = 10 000) 中, 两端用棉线扎紧。将其置于 50 mL 含有 0.1  $g \cdot L^{-1}$  聚山梨酯 80 的 PBS 中, 37 °C 条件下, 以 100  $r \cdot \text{min}^{-1}$  恒温震荡 72 h。在 0.5、1、2、4、8、12、24、36、48 h 分别取出 0.5 mL 释放介质, 同时补充 0.5 mL 新鲜的相同释放介质。于最后一个时间点取样完成后, 将透析袋剪破, 继续震荡 2 h, 作为剩余药量计算。将取出的释放介质置于高速离心机, 12 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 后, 取出产物以紫外分光光度仪测定累计药物释放量, 绘制出药物的累积释放曲线。

### 2.6 激光共聚焦观察细胞摄取情况

香豆素 6 (coumarin 6, C6) 是一种激光转化率高, 脂溶性的荧光染料。按照“2.2”项下工艺制备 Tf-C6@Lipo。称取适量的 C6 粉末, 加入无水乙醇溶液溶解, 制备成 1  $mg \cdot mL^{-1}$  的储备液。在 25 mL 圆底烧瓶中, 称取 DPPC 1.6 mg、CHOL 1.4 mg、DSPE-PEG2000 0.8 mg 粉末溶于三氯甲烷中, 加入

200  $\mu\text{L}$  C6 溶液, 超声 2 min 使其完全溶解。于 40 °C 水浴旋蒸 30 min 除去三氯甲烷, 使药物在器壁上形成一层均匀的薄膜。加入 2 mL PBS 至薄膜上水化 1 h, 随后冰水浴探头超声 10 min (功率 65 W, 超声 2 s, 间歇 2 s) 得到 C6@Lipo。上述原料再加入 DSPE-PEG2000-Tf 0.4 mg 经同样方法即可得到 Tf-C6@Lipo。

取对数生长期的 4T1 细胞, 在 12 孔板底部预先铺上直径为 20 mm 的细胞爬片, 将 4T1 细胞接种于该 12 孔板中, 每个孔的细胞数为  $1 \times 10^5$  个, 在培养箱内以 37 °C、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h, 使其贴壁。24 h 后吸去旧培养基, 向孔中加入提前用无血清 1640 培养基稀释的游离 C6 溶液、C6@Lipo、Tf-C6@Lipo (C6 质量浓度为 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 继续培养 4 h。培养停止后, 吸弃旧培养基, 用冷 PBS 清洗细胞 3 次, 4  $g \cdot L^{-1}$  多聚甲醛固定细胞 15 min, 每孔中再加入质量浓度为 1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染液 500  $\mu\text{L}$ , 对细胞核进行染色。染色 15 min 后再用 PBS 洗涤 3 次, 最后将细胞爬片取出, 倒扣在含有抗荧光衰减封片剂的载玻片上, 置于激光共聚焦显微镜 (CLSM) 下观察各组细胞的绿色荧光强度并拍照。

### 2.7 流式细胞仪检测细胞摄取情况

取对数生长期的 4T1 细胞, 以每孔  $1.2 \times 10^5$  个的密度接种于 12 孔板中, 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁。24 h 后吸去旧培养基, 每孔中分别加入提前用无血清 1640 培养基稀释的 C6、C6@Lipo、Tf-C6@Lipo 溶液 (C6 质量浓度为 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 继续孵育 4 h。培养停止后, 吸去旧培养基, 加入冷 PBS 冲洗细胞 3 次, 再加入无乙二胺四乙酸 (EDTA) 的胰酶 0.5 mL 进行消化, 最后加入 1.5 mL 新鲜培养基终止消化, 离心 5 min 后将细胞重悬于 0.5 mL PBS 中, 用流式细胞仪检测细胞摄取情况。

### 2.8 CCK8 实验测定 4T1 细胞增殖抑制情况

4T1 细胞培养至对数生长期, 以每孔  $8 \times 10^3$  个加入 96 孔板, 培育 24 h 后, 分别加入游离 IR820、IR820@Lipo 和 Tf-IR820@Lipo, 药物质量浓度依次为 5、1、0.5、0.1、0.05  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 培养 4 h。然后将细胞暴露在 808 nm (0.5  $\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) 激光 (Laser) 下照射 10 min, 再继续培养 24、48 及 72 h。吸弃旧培养基, 加入 10  $\mu\text{L}$  CCK8 溶液继续培养 0.5 ~ 3 h, 测定细胞在 450 nm 处的吸光度值, 记录结果并计算出

不同药物浓度下细胞增殖抑制率。

## 2.9 体外活性氧(ROS)检测

取对数生长期的 4T1 细胞,在 12 孔板底部预先铺上直径为 20 mm 的无菌盖玻片作为细胞爬片,将 4T1 细胞以每孔  $1 \times 10^5$  个的密度接种于该孔板中。于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养 24 h 使细胞贴壁。24 h 后吸去旧培养基,除对照组外,分别加入质量浓度为  $0.5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 IR820,分成对照(control)、IR820@ Lipo、Tf-IR820@ Lipo、IR820@ Lipo + Laser 和 Tf-IR820 @ Lipo + Laser 5 组,继续培养 4 h。培养停止后,吸弃旧培养基,用冷 PBS 清洗 3 次,加入  $20\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ROS 检测探针,4 h 后将细胞暴露在  $808\text{ nm}$  ( $0.5\text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) 激光下照射 10 min,最后将细胞爬片置于 CLSM 检测。观察各组细胞的荧光强度并拍照。

## 2.10 小鼠乳腺癌原位模型建立及药物的体内分布

按照“2.2”中的工艺制备载细胞膜荧光探针细胞膜近红外荧光探针(DiR)的脂质体。用乙腈溶解 DiR,制备成  $0.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备液。在 25 mL 圆底烧瓶中,称取 DPPC 0.4 mg、CHOL 0.35 mg、DSPE-PEG2000 0.2 mg 粉末溶于三氯甲烷中,加入 50  $\mu\text{L}$  DiR 溶液,超声 2 min 使其完全溶解。于  $40\text{ }^\circ\text{C}$  水浴旋蒸 30 min 除去三氯甲烷,使药物在器壁上形成一层均匀的薄膜。加入 2 mL PBS 至薄膜上水化 1 h,随后冰水浴探头超声 10 min(功率 65 W,超声 2 s,间歇 2 s)得到 DiR@ Lipo。上述原料再加入 DSPE-PEG2000-Tf 0.1 mg 经同样方法即可得到 Tf-DiR@ Lipo。

用胰酶消化 4T1 细胞,加 PBS 终止反应,混匀使之形成单细胞悬液, $1\text{ }500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下离心 5 min。将细胞浓度调整为每毫升  $1 \times 10^5$  个,准备注射。BALB/c 小鼠 15 只,分为 3 组,每组 5 只,每只在左前腿侧面(腋窝下)注射悬液 0.1 mL(约  $3 \times 10^6$  个细胞),建造原位乳腺癌小鼠模型。当皮下肿瘤体积约达到  $120\text{ mm}^3$  时,分别尾静脉注射游离 DiR、载 DiR 的 Lipo(DiR@ Lipo)和载 DiR 的 Tf 修饰的脂质体(Tf-DiR@ Lipo),按照  $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量,进行荧光探针检测药物体内分布情况。

## 2.11 Tf-IR820@ Lipo 的体内药理学研究

另取 BALB/c 小鼠 15 只,分为 5 组,每组 3 只,每只在左前腿侧面(腋窝下)注射悬液 0.1 mL(约  $3 \times 10^6$  个细胞),建造原位乳腺癌小鼠模型。当皮下肿瘤体积约达到  $150\text{ mm}^3$  时,分别尾静脉给予生理盐水、空白 Lipo、游离 IR820、IR820@ Lipo 和 Tf-

IR820@ Lipo。末次给药后的第 3 天将小鼠处死,收集各组肿瘤大小进行评估,再对肿瘤组织进行苏木精-伊红(HE)染色。另外,为了检测各制剂对小鼠的毒副作用,在给药期间每 3 d 监测小鼠的体质量变化。最后通过检测小鼠血清中的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、肌酐(Cr)和血尿素氮(BUN)的变化来评价小鼠肝肾功能,

## 3 结果

### 3.1 载体材料的合成

DSPE-PEG2000-Tf,其核磁结果图见图 1。从图 1A 中可以看出,DSPE-PEG-Mal 中的 Mal 特征吸收峰出现在 6.70 处,但是从图 1B 可见 Mal 的特征吸收峰消失,说明 DSPE-PEG-Mal 中的 Mal 基团与 Tf 的巯基(SH)相反应,生成了产物 DSPE-PEG-Tf。

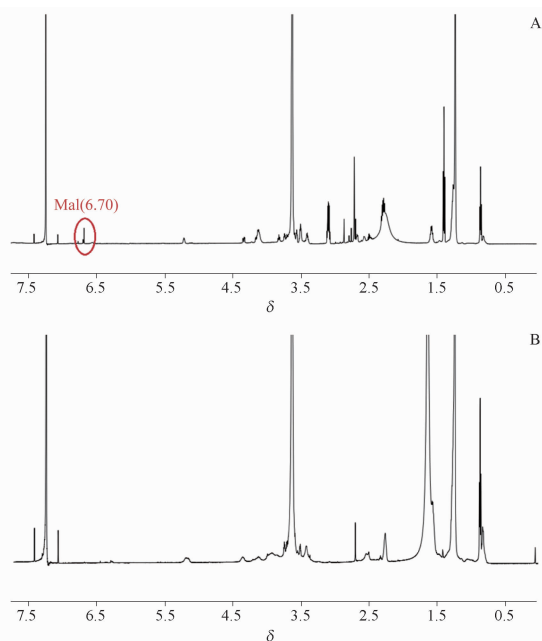


图 1 磷脂聚乙二醇马来酰亚胺(DSPE-PEG-Mal)(A)和磷脂聚乙二醇转铁蛋白(DSPE-PEG-Tf)(B)的核磁共振谱

Fig. 1 Nuclear magnetic results of DSPE-PEG-Mal (A) and DSPE-PEG-Tf (B)

### 3.2 Tf 修饰脂质体剂粒径、电位及包封率

IR820@ Lipo 粒径为  $(84.30 \pm 15.66)\text{ nm}$  (PDI: 0.068),电位为  $(-8.21 \pm 2.06)\text{ mV}$ ; Tf-IR820@ Lipo 粒径为  $(116.20 \pm 14.68)\text{ nm}$  (PDI: 0.055),电位为  $(-5.23 \pm 1.19)\text{ mV}$ (图 2)。Zeta 电位(图 3)显示脂质体颗粒分散特性稳定。透射电镜(TEM)(图 4)显示,2 种制剂粒径大小合适,分布均匀合理,IR820@

Lipo 的包封率为(94.61 ± 0.67)%,载药量为(8.82 ± 0.92)%; Tf-IR820 @ Lipo 的包封率为(95.55 ± 0.83)%,载药量为(8.92 ± 1.01)%。

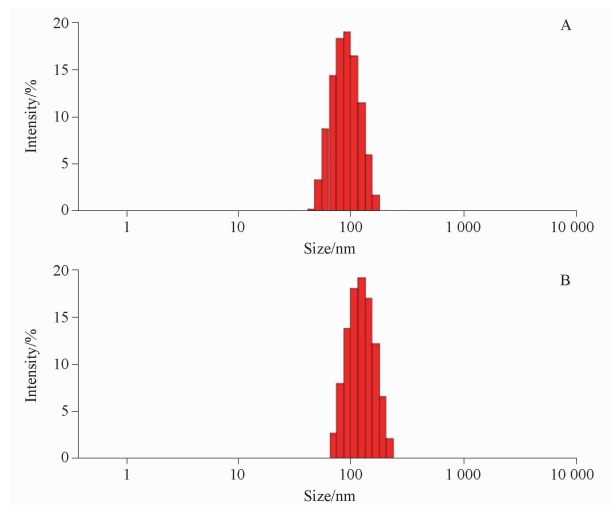


图2 载 IR820 脂质体 (IR820@Lipo) (A) 和 Tf 修饰的载 IR820 脂质体 (Tf-IR820)@Lipo (B) 的粒径分布图

Fig. 2 Particle size of IR820@Lipo (A) and Tf-IR820@Lipo (B)

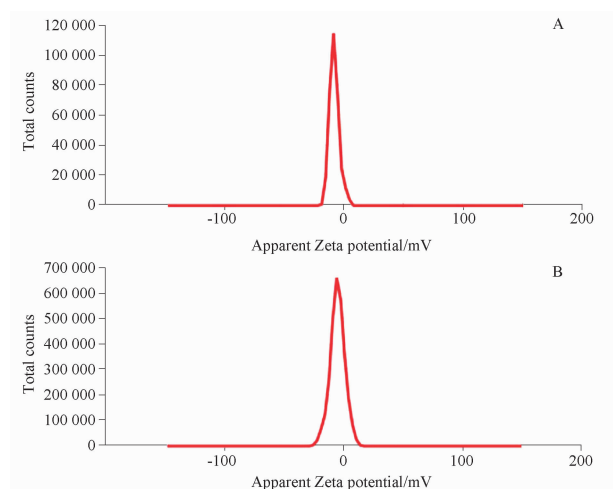


图3 IR820@Lipo (A) 和 Tf-IR820@Lipo (B) 的 Zeta 电位结果图

Fig. 3 Zeta potential results for IR820@Lipo (A) and Tf-IR820@Lipo (B)

### 3.3 Tf-IR820@Lipo 稳定性考察

体外稳定性 (图 5) 显示, IR820 @ Lipo 和 Tf-IR820@Lipo 在静置 7 d 内, 粒径和 PDI 值均无明显变化, 提示 2 组脂质体稳定性良好。

### 3.4 Tf-IR820@Lipo 体外药物释放

根据药物的累积释放曲线 (图 6) 显示, 24 h

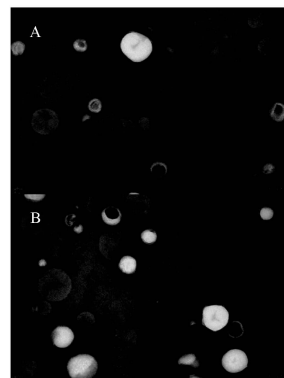


图4 IR820@Lipo (A) 和 Tf-IR820@Lipo (B) 的透射电镜 (TEM) 图 (×300 000)

Fig. 4 TEM electron microscopy of IR820@Lipo (A) and Tf-IR820@Lipo (B) (×300 000)

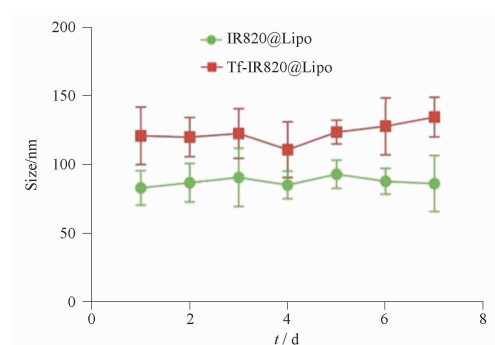


图5 IR820@Lipo 和 Tf-IR820@Lipo 体外稳定性评价.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 IR820@Lipo and Tf-IR820@Lipo *In vitro* stability evaluation.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

内游离 IR820 组累积释放率超过 90%, Tf-IR820@Lipo 组 24 h 累积释放率约为 50%, 并达到释放平台期。与游离 IR820 相比, Tf-IR820@Lipo 的释放均较为缓慢, 说明脂质体具有一定的缓释作用。

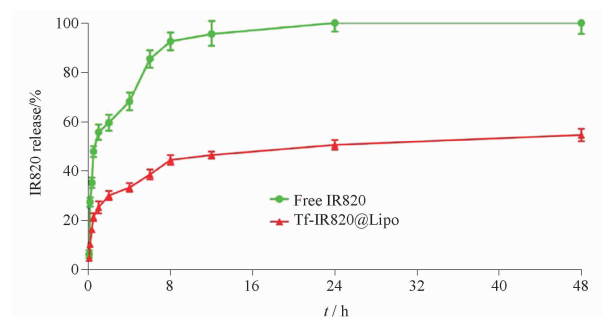


图6 Tf-IR820@Lipo 体外释放曲线图.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 Cumulative drug release curve.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

### 3.5 激光共聚焦观察细胞摄取情况

与游离 C6 及 C6@Lipo 相比, Tf-C6@Lipo 摄取

更多,具有良好的细胞靶向性,见图7。

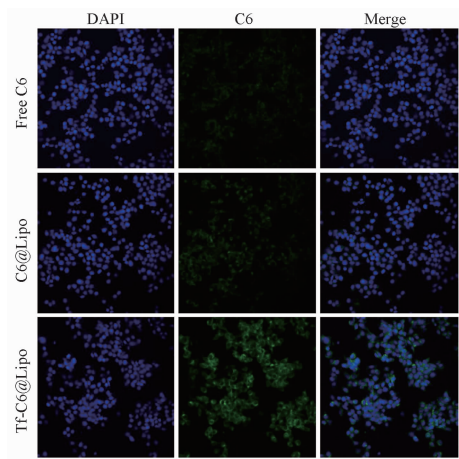
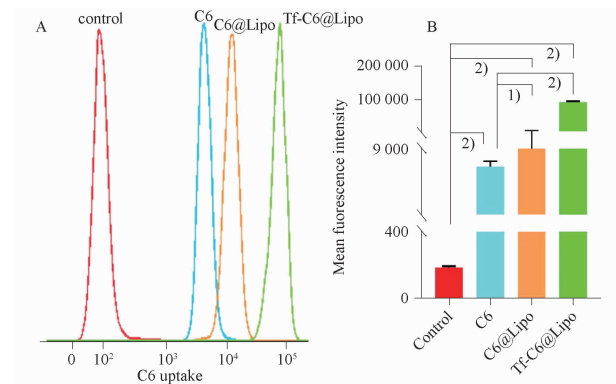


图7 激光共聚焦 (CLSM) 观察 4T1 细胞对 Tf-C6@ Lipo、C6 @ Lipo 和游离 C6 的摄取情况 (×100)

Fig. 7 The uptake of Tf-C6@ Lipo, C6@ Lipo and free C6 by 4T1 cells observed by laser confocal (×100)

### 3.6 流式细胞仪检测细胞摄取情况

流式细胞实验结果显示,与 Tf-C6@ Lipo 和 Free C6 相比, Tf-C6@ Lipo 能够被更多的细胞所摄取。提示不论是数量还是程度, Tf-C6@ Lipo 都能够更好地被 4T1 细胞所摄取,靶向性最高(图8)。



A - 摄取峰形图; B - 摄取棒图; 组间比较, <sup>1)</sup>P < 0.01, <sup>2)</sup>P < 0.05。

A - peak graph; B - bar diagram; <sup>1)</sup>P < 0.01, <sup>2)</sup>P < 0.05, compared between groups.

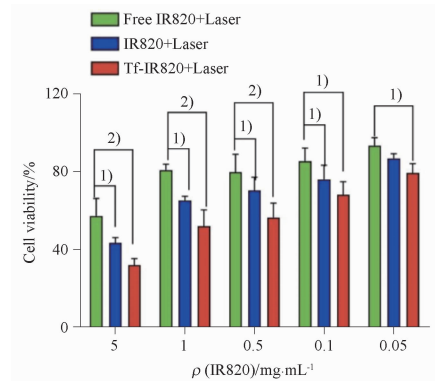
图8 流式细胞术考察细胞摄取情况. n = 3

Fig. 8 Flow cytometry detected the number of cells taken up. n = 3

### 3.7 CCK8 实验测定 4T1 细胞增殖抑制情况

从 CCK8 实验(图9)结果可知,3 种制剂结合激光照射对 4T1 细胞的增殖均有一定的抑制作用,其中 Tf-IR820@ Lipo + Laser 对 4T1 细胞的抑制作用要明显强于 IR820@ Lipo + Laser 和游离 IR820 + Laser

组,提示其对 4T1 细胞的增殖抑制作用最强。



组间比较, <sup>1)</sup>P < 0.01, <sup>2)</sup>P < 0.05。

<sup>1)</sup>P < 0.01, <sup>2)</sup>P < 0.05, compared between groups.

图9 CCK8 考察脂质体对细胞增殖抑制情况. n = 3,  $\bar{x} \pm s$

Fig. 9 The inhibitory effect of liposome on cell proliferation was detected by CCK8. n = 3,  $\bar{x} \pm s$

### 3.8 体外 ROS 检测

Control 组在显微镜下无荧光显像,而加入 Tf-IR820@ Lipo 组并光照后的细胞内绿色荧光强度明显增强,表明经脂质体处理后,4T1 细胞在激光照射过程中有强 ROS 产生(图10)。

### 3.9 小鼠乳腺癌原位模型建立及药物的体内分布

荧光探针检测药物体内分布情况(图11),对照组内仅有少量的制剂聚集, DiR@ Lipo 和 Tf-DiR@ Lipo 组肿瘤内制剂的聚集情况要明显高于对照组,而 Tf-DiR@ Lipo 在小鼠肿瘤内聚集最多。

### 3.10 Tf-IR820@ Lipo 的体内药效学研究

从原位乳腺癌荷瘤小鼠的肿瘤生长抑制方面研究了不同制剂的体内治疗效果。根据图12A和图12B显示,生理盐水组(Control)和空白脂质体组(Blank Lipo)肿瘤生长无明显差异,而 Tf-IR820@ Lipo 对肿瘤的抑制作用显著强于其他各组。从肿瘤组织 HE 染色(图12C)可知,Control 组和 Blank Lipo 组镜下几乎没有凋亡细胞,游离 IR820 组、IR820@ Lipo 组只有少量的凋亡细胞,而 Tf-IR820@ Lipo 组可见大量的肿瘤细胞凋亡,进一步说明 Tf-IR820@ Lipo 可以抑制乳腺癌细胞生长并诱导其凋亡。另外,图13A可见治疗期间各组小鼠的体重无明显变化,提示制剂在维持机体一般状态及稳定性方面相差不大。图13B结果显示脂质体未造成小鼠的肝肾功能损伤,无明显的毒副作用。

## 4 讨论

PDT 是一种通过光敏剂、光源和氧分子三者

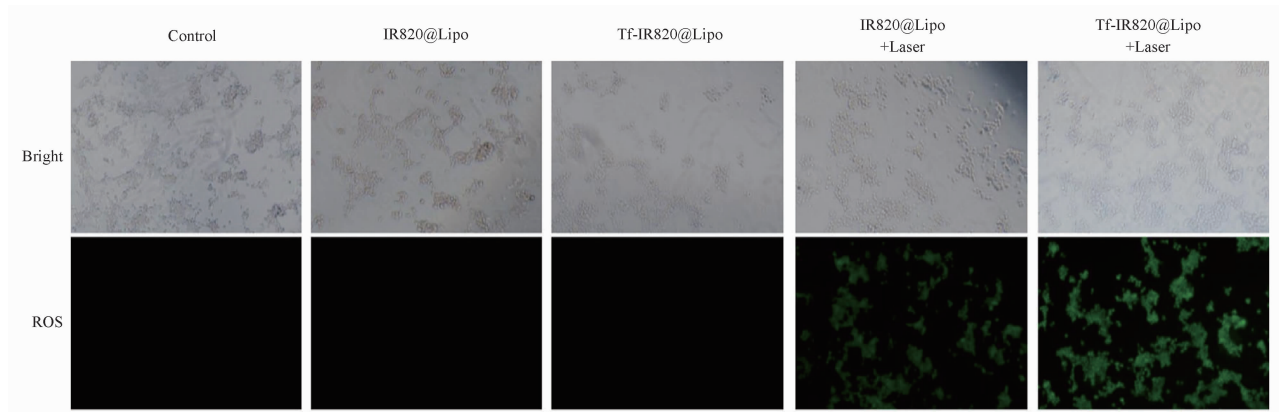
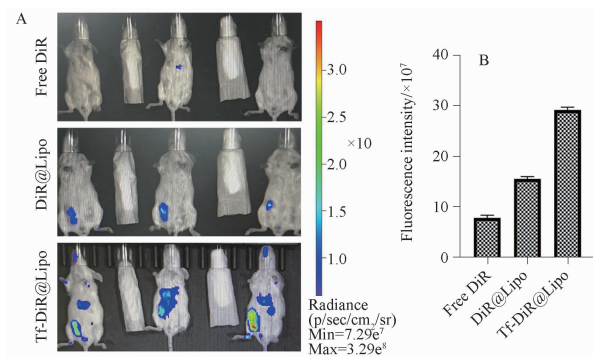


图 10 各组体外活性氧检测结果 ( $\times 100$ )

Fig. 10 *In vitro* reactive oxygen species detection results of each group ( $\times 100$ )



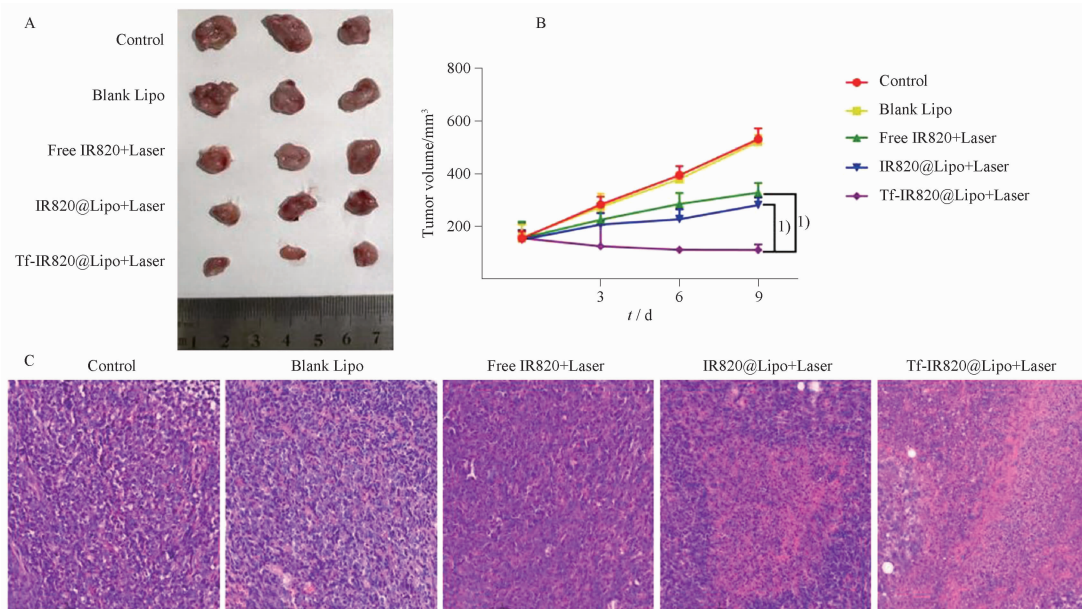
A - 体内分布图; B - 荧光强度棒图。

A - *in vivo* distribution map; B - fluorescence intensity bar plot.

图 11 24 h 后药物的体内分布情况.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 11 Drug distribution in mice after 24 h.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

之间的相互作用来治疗肿瘤、病毒感染、细菌感染和其他疾病的治疗方法<sup>[12-14]</sup>。1900年由丹麦医生Finsen首次提出,1913年,德国生物物理学家Raab发现了染料短时间内的光化学反应,并于1924年开展了与PDT有关的最早实验<sup>[15]</sup>。PDT主要原理为光敏剂被激发后发生光敏反应,产生大量ROS,从而诱导细胞凋亡或致细胞死亡<sup>[16-17]</sup>。而传统化疗是以化学药物通过抑制癌细胞DNA复制、RNA转录和蛋白质合成来实现抗癌作用<sup>[18]</sup>。目前,PDT结合化疗已成为一种较为热门的微创肿瘤治疗方式,已被广泛用于黑色素瘤、鲜红斑痣及老年黄褐斑变性等疾病的治疗<sup>[19-20]</sup>。在PDT的治疗过程中,需要

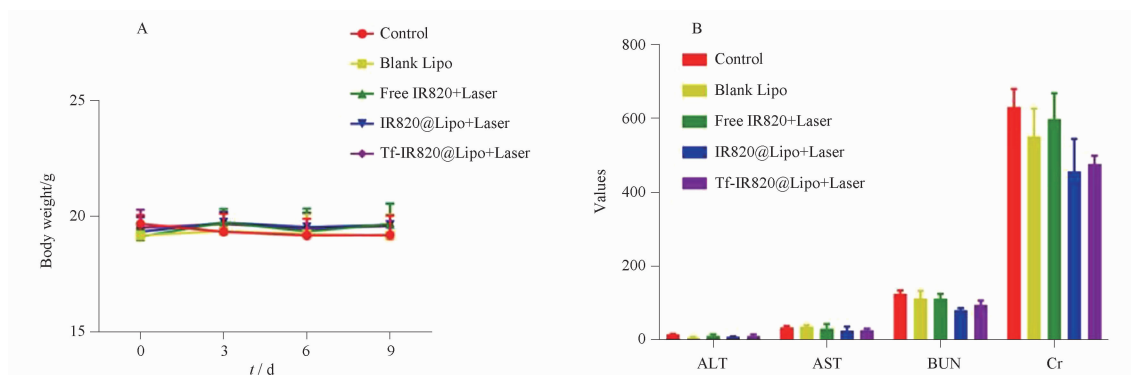


A - 肿瘤大小图; B - 肿瘤体积变化; C - 肿瘤组织 HE 染色 ( $\times 500$ )。

A - tumor size diagram; B - changes in tumor volume; C - HE staining of tumor tissue ( $\times 500$ ).

图 12 各组接受治疗小鼠体内药效学研究.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 12 *In vivo* pharmacodynamic study of treated mice in each group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$



A - 小鼠体质量变化; B - 小鼠肝肾功能指标。

A - body weight changes; B - liver and kidney function in mice.

图 13 各组接受治疗小鼠毒副作用研究.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 13 Toxic and side effects of treated mice in each group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

将光敏剂导入靶组织,利用特定波长和能量密度的激光照射后发生光敏反应,通过产生大量 ROS 诱导细胞凋亡和死亡<sup>[21]</sup>。但是,大部分光敏剂的激发波长在紫外或可见光范围内,波长短穿透力弱,对距体表位置深的病灶治疗效果较差。为此研究者研发制备了激发波长正好位于“光学透明窗口”(600 ~ 1 100 nm)的上转换纳米粒子(upconverting nanoparticles, UCNPs),进一步提升了组织穿透性<sup>[22]</sup>。本研究制备的 Tf-IR820@ Lipo 激发波长正处于此范围,因此对位置较深的乳腺癌具有较好的治疗作用。另外,许多学者又通过对光源技术及光敏剂等方面的改进<sup>[23-24]</sup>,使 PDT 技术得以不断进步并且应用越来越广泛,有望成为未来治疗肿瘤和其他疾病的重要手段。

本研究制备的 IR820@ Lipo 和 Tf-IR820@ Lipo 两种制剂大小适宜、分布均匀、分散性稳定,具有明显的缓释效应,不易被循环系统快速清除。同时两者均具有较好的载药量及包封率,具备优越的载药性能。利用 C6 在激光共聚焦显微镜下观察药物的入胞情况,结果显示 Tf-IR820@ Lipo 具有良好的人胞效率。因此,当其携带抗肿瘤药物时,对 4T1 细胞有着更好的杀伤作用<sup>[25]</sup>,这是由于 IR820@ Lipo 和 Tf-IR820@ Lipo 同时具有水性内核和磷脂双分子层包膜,能够同时包载亲水和亲脂性药物,因而较其他载体能够更好地进入 4T1 细胞中发挥抗癌作用<sup>[26]</sup>。

IR820 在结构上与吡啶菁绿(ICG)相似,后者是临床批准的染料,但 IR820 在体外和体内的稳定性更好,有研究已将 IR820 应用于 PDT 抗肿瘤治疗<sup>[27-28]</sup>。Tf-IR820@ Lipo 在激光照射下,可使 4T1 细胞内 ROS 上升,通过打破胞内 ROS 的平衡,使

ROS 水平超过 4T1 细胞耐受阈值而致使细胞死亡<sup>[29]</sup>。以 CCK8 法测定 IR820@ Lipo 和 Tf-IR820@ Lipo 对 4T1 细胞增殖抑制情况时,发现 3 种制剂 + Laser 对 4T1 细胞的增殖均有一定的抑制作用,其中 Tf-IR820@ Lipo + Laser 组对 4T1 细胞的抑制作用最强。体外 ROS 检测结果表明,Tf-IR820@ Lipo 在激光照射下可使 4T1 细胞内产生大量 ROS,证明了光敏性脂质体的 PDT 效应,因而可对乳腺癌 4T1 细胞可起到良好的杀伤作用。

本研究以 4T1 细胞成功建立了原位乳腺癌小鼠模型,通过观察发现瘤体的生长符合肿瘤数量-时间依赖性,与用药效果呈现良好的效比关系,因此可以客观评价脂质体在小鼠体内的代谢、分布以及作用情况。在图 11 中,不同的药物积累水平用颜色表示,蓝色表示药物积累较低,红色表示药物积累较高,没有荧光可以忽略药物积累。游离 DiR 组由于代谢快和储存少,药物在肠道和肿瘤内的蓄积较低,因而几乎没有荧光显示。相反,Tf-DiR@ Lipo 在肿瘤中具聚集最多,说明其靶向性最高。从图 11 中也可看到 Tf-DiR@ Lipo 在肿瘤中的药物累积量最多。体内药效学研究显示,Tf-IR820@ Lipo 对肿瘤的抑制作用显著强于其他各组且毒副作用不明显,这是因为连接 Tf 的脂质体具有主动靶向作用,因此在肿瘤部位中蓄积最多,当结合激光照射时可起到良好的抗癌效果,同时药物在正常组织中的蓄积减少,也使毒副作用明显下降。现阶段在临床上,PDT 已成为不同癌症的重要替代治疗选择,同时还可以在不影响患者生活质量的情况下提高生存率。但是,PDT 联合化疗在临床推广过程中仍存在一些不足之处,如光照深度不足限制了对位置较深肿物的治疗

效果,对光照的操控度不易掌握、各种化疗药物在联合治疗时协同性差等问题<sup>[30-31]</sup>,这些均需要未来在临床实践中积累更多的资料来解决。

Tf-IR820@Lipo 以其高靶向性、高疗效及低毒性有望成为治疗乳腺癌的新型制剂,结合 PDT 可以为无法接受手术的晚期乳腺癌患者提供一种新的选择,也为临床治疗乳腺癌提供了一种新的思路。

## REFERENCES

- [ 1 ] LI J B, ZOU X N. Incidence and mortality of cancer in China, 2016 [J]. *J Environ Hyg* (环境卫生学杂志), 2023, 13(1): 45-47, 53.
- [ 2 ] CUI F F, WANG L L, LI C C, *et al.* Analysis on the trends and projections of disease burden of breast cancer and cervical cancer among women in China from 1990 to 2019 [J]. *Chin J Health Stat* (中国卫生统计), 2022, 39(5): 647-652.
- [ 3 ] SEMIGLAZOV V F S, PESOTSKY R S P, TSELUIKO A I T, *et al.* Search for new prognostic and predictive markers of sensitivity to endocrine therapy, chemotherapy and immunotherapy of breast cancer [J]. *Pharmateca*, 2021, 7(4): 33-41.
- [ 4 ] JIANG Y Z, LIU Y, XIAO Y, *et al.* Molecular subtyping and genomic profiling expand precision medicine in refractory metastatic triple-negative breast cancer: the Future trial [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 178-186.
- [ 5 ] GIV N H, BAHRAMI A R, MATIN M M. Application of bacterial directed enzyme prodrug therapy as a targeted chemotherapy approach in a mouse model of breast cancer [J]. *Int J Pharm*, 2021, 606(10): 120931-120940.
- [ 6 ] ZHANG H, GONG X, TANG M. Multi-omics data analysis for cancer research: colorectal cancer, liver cancer and lung cancer [J]. *Methodol Multi-Omics Data Integr Data Min*, 2023, 19(6): 77-99.
- [ 7 ] ZHU X, YU Z, FENG L, *et al.* Chitosan-based nanoparticle co-delivery of docetaxel and curcumin ameliorates anti-tumor chemotherapeutic in lung cancer [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 268(10): 118237-118244.
- [ 8 ] LI L, ZHANG Q, LI J, *et al.* Targeted delivery of doxorubicin using transferrin-conjugated carbon dots for cancer therapy [J]. *ACS Appl Biol Mater*, 2021, 4(9): 7280-7289.
- [ 9 ] LIN L, CHEN H, ZHAO R, *et al.* Nanomedicine targets iron metabolism for cancer therapy [J]. *Cancer sci*, 2022, 113(3): 828-837.
- [ 10 ] JIN G M, JIN M J, JIN Z H, *et al.* Docetaxel-loaded PEG-albumin nanoparticles with improved antitumor efficiency against non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(2): 871-876.
- [ 11 ] JIN G M, JIN M J, YIN X Z, *et al.* A comparative study on the effect of docetaxel-albumin nanoparticles and docetaxel-loaded PEG-albumin nanoparticles against non-small cell lung cancer [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5): 1945-1953.
- [ 12 ] YU X, YE T. Research progress on photodynamic therapy combined with PD-1/PD-L1 inhibitors in anti-tumor therapy [J]. *J New Med*, 2023, 54(2): 106-109.
- [ 13 ] ZHOU Y, ZENG W, WANG M, *et al.* Ultrasmall pH-responsive silicon phthalocyanine micelle for selective photodynamic therapy against tumor [J]. *J Innov Opt Heal Sci*, 2022, 6(10): 87-99.
- [ 14 ] HUA H, ZHOU S, GU L, *et al.* Multiple-type HPV infection predicting condyloma acuminatum recurrence after aminolevulinic acid photodynamic therapy [J]. *Photodiagn Photodyn*, 2021, 36(4): 102538-102551.
- [ 15 ] RAO J, ADAMS S. Photodynamic therapy [J]. *Compr Dermatol Drug Ther Fourth Ed*, 2021, 10(1): 25-41.
- [ 16 ] XU F Z, WANG C Y, WANG Q, *et al.* Water-soluble bright NIR AIEgens with hybrid ROS for wash-free mitochondrial "off-on" imaging and photodynamic therapy [J]. *Chem Commun*, 2022, 58(44): 6393-6396.
- [ 17 ] CHEN C, WU C, YU J, *et al.* Photodynamic-based combinatorial cancer therapy strategies: Tuning the properties of nanoplastform according to oncotherapy needs [J]. *Coordin Chem Rev*, 2022, 461(6): 1225-1246.
- [ 18 ] KUNISKY A, ANYAECHE V, HERRON R, *et al.* Shift in MSL1 alternative polyadenylation in response to DNA damage protects cancer cells from chemotherapeutic agent-induced apoptosis [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(2): 109815-109823.
- [ 19 ] CHEN J, FAN T, XIE Z, *et al.* Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: status and challenges [J]. *Biomater*, 2020, 237(12): 119827-119834.
- [ 20 ] YANG K Z, NIU T, LUO M Y, *et al.* Enhanced cytotoxicity and apoptosis through inhibiting autophagy in metastatic potential colon cancer SW620 cells treated with Chlorin e6 photodynamic therapy [J]. *Photodiagn Photodyn Ther*, 2018, 24(4): 332-341.
- [ 21 ] HANG L, WEI J, QIN W, *et al.* ROS-sensitive biomimetic nanocarriers modulate tumor hypoxia for synergistic photodynamic chemotherapy [J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(9): 3706-3716.
- [ 22 ] CALIXTO G M F, DE ANNUNZIO S R, VICTORELLI F D, *et al.* Chitosan-based drug delivery systems for optimization of photodynamic therapy: a review [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2019, 20(7): 1-17.
- [ 23 ] KANG J H, KO Y T. Dual-selective photodynamic therapy with a mitochondria-targeted photosensitizer and fiber optic cannula for malignant brain tumors [J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(7): 2812-2825.
- [ 24 ] MIN X, Yi F, HAN X L, *et al.* Targeted photodynamic therapy using a water-soluble aggregation-Induced emission photosensitizer activated by an acidic tumor microenvironment [J]. *Chem Eng J*, 2022, 432(2): 134327-13440.
- [ 25 ] YAN C, SHI W, GU J, *et al.* Design of a novel nucleus-targeted NLS-KALA-SA nanocarrier to delivery poorly water-soluble anti-tumor drug for lung cancer treatment [J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110(6): 2432-2441.
- [ 26 ] MA N H, LU L, DING Y, *et al.* Preparation of doxorubicin hydrochloride and timosaponin AIII co-loaded liposomes and determination of encapsulation efficiency [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50(1): 69-75.
- [ 27 ] LI W, PENG J, TAN L, *et al.* Mild photothermal therapy/photodynamic therapy/chemotherapy of breast cancer by Lyp-1 modified docetaxel/IR820 co-loaded micelles [J]. *Biomaterials*, 2021, 269(8): 120375-120392.
- [ 28 ] TAN B, WU Y, WU Y, *et al.* Curcumin-microsphere/IR820 hybrid bifunctional hydrogels for in situ osteosarcoma chemo-cothermal therapy and bone reconstruction [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(27): 31542-31553.
- [ 29 ] SARKAR M K, VADIVEL V, RAJA M R C, *et al.* Potential anti-proliferative activity of AgNPs synthesized using *M. longifolia* in 4T1 cell line through ROS generation and cell membrane damage [J]. *J Photoch Photobio B*, 2018, 186(5): 160-168.
- [ 30 ] GRIN M, OSTROVERKHOV P, SUVOROV N, *et al.* Potential agents for combined photodynamic and chemotherapy in oncology based on Pt(II) complexes and pyridine-containing natural chlorins [J]. *J Porphyr Phthalocya*, 2023, 27(4): 728-740.
- [ 31 ] LI Y, HAN W, HE C, *et al.* Nanoscale coordination polymers for combined chemotherapy and photodynamic therapy of metastatic cancer [J]. *Bioconjugat Chem*, 2021, 32(11): 2318-2326.

(收稿日期:2023-07-19)