三苯基膦修饰的柔红霉素/莪术醇纳米脂质体的构建及其抗膀胱癌作用

邹乃建[1]，常　雷[1]，吴　珺[2]，李佳朋[3]，曾宪梓[1]，鹿英强[1*]

（1. 辽宁中医药大学附属医院，辽宁沈阳 110032；2. 辽宁中医药大学附属第二医院，辽宁沈阳 110034；3. 辽宁中医药大学第一临床学院，辽宁沈阳 110847）

摘要：该研究采用薄膜分散-硫酸铵水化法，设计并制备了三苯基膦（TPP）修饰的共载柔红霉素（**1**）和莪术醇（**2**）的纳米脂质体（TPP-**1**/**2**-Lip）。通过Box-Behnken设计结合响应面法优化所得的纳米脂质体粒径为（74.30±2.71）nm，PDI为0.07±0.02，ζ电位为（0.40±0.17）mV，且在4 ℃环境中贮存稳定性良好。体外细胞试验表明，该纳米脂质体中2种药物的协同评分为12.99（大于10），提示具有显著的协同效应。同时，该制剂可被人膀胱癌细胞（KU-19-19细胞）高效摄取，通过靶向肿瘤细胞线粒体，诱导细胞凋亡，抑制细胞增殖与迁移，并阻断血管拟态形成，其抗肿瘤效果优于非靶向或单药脂质体。该研究设计的线粒体靶向和双药协同的递药策略可为克服膀胱癌化疗耐药和转移问题提供新思路。

关键词：柔红霉素；莪术醇；三苯基膦；纳米脂质体；膀胱癌；协同效应；抗肿瘤活性；细胞摄取

中图分类号：R979.1　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)09-1083-10

引用：邹乃建, 常雷, 吴珺, 等. 三苯基膦修饰的柔红霉素/莪术醇纳米脂质体的构建及其抗膀胱癌作用[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(9): 1083-1092. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.09.008

Construction of Triphenylphosphine-modified Daunorubicin/Curcumol Nanoliposomes and Their Antitumor Activity against Bladder Cancer

ZOU Naijian[1], CHANG Lei[1], WU Jun[2], LI Jiapeng[3], ZENG Xianzi[1], LU Yingqiang[1*]

(*1. The First Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032; 2. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034; 3. The First Clinical College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847*)

ABSTRACT: The triphenylphosphine (TPP)-modified nanoliposomes co-loaded with daunorubicin (**1**) and curcumol (**2**), named TPP-**1**/**2**-Lip, were designed and prepared by a thin-film dispersion-ammonium sulfate hydration method. The formulation was optimized by Box-Behnken design combined with response surface methodology. The particle size, PDI, and ζ potential of the optimized TPP-**1**/**2**-Lip were (74.30±2.71) nm, 0.07±0.02, and (0.40±0.17) mV, respectively. And the TPP-**1**/**2**-Lip showed good stability at 4 ℃. *In vitro* cellular assays showed that the synergistic score of the two drugs in the nanoliposomes was 12.99 (greater than 10), indicating a significant synergistic effect. Meanwhile, the nanoliposomes could be efficiently taken up by human bladder cancer cells (KU-19-19 cells). By targeting the mitochondria of tumor cells, they induced apoptosis, inhibited cell proliferation and migration, and blocked vasculogenic mimicry, showing superior efficacy to that of the non-targeted nanoliposomes or nanoliposomes with a single drug. In summary, the mitochondrial-targeting and dual-drug synergistic delivery strategy developed in this study provides a novel idea for overcoming chemotherapy resistance and metastasis in bladder cancer.

Key Words: daunorubicin; curcumol; triphenylphosphine; nanoliposome; bladder cancer; synergistic effect; antitumor activity; cellular uptake

膀胱癌（bladder cancer，BC）是起源于膀胱黏膜上皮组织的常见恶性肿瘤。2022 年，全球 BC 新发病例约 61.4 万例，死亡约 20 万例[1]，发病率与死亡率分别居全球恶性肿瘤第 10 位和第 13 位，5 年总生存率为 77%[2]。目前，晚期和转移性膀胱癌的一线治疗方案仍以基于铂类的联合化疗为主[3]。但化疗存在疗效有限、药物靶向性差、易产生耐药性及对机体正常组织损伤较大等问题[4]，需开发更高效、更安全的治疗策略[5]。

肿瘤细胞线粒体膜电位显著低于正常细胞（绝对值更大）[6]，而三苯基膦（triphenylphosphine，TPP）作为一种带正电荷的阳离子，可依赖跨膜电位差穿透细胞膜并主动富集于肿瘤细胞的线粒体[7]。通过在纳米载体表面修饰 TPP，可引导药物在进入肿瘤细胞后进一步靶向线粒体，提升药物在作用位点的局部浓度，同时减少对正常细胞的损伤。该策略为肿瘤细胞内精准递药提供了新的研究思路。

柔红霉素（daunorubicin，**1**）是一种蒽环类广谱抗肿瘤药，能通过干扰 DNA 合成和调控凋亡通路发挥抗肿瘤功效[8]。但 **1** 半衰期短，易产生耐药性及心脏毒性，临床应用受限，常需与其他药物联合应用[9]。莪术醇（curcumol，**2**）是一种天然倍半萜类化合物，可通过阻断 PI3K-Akt 信号通路等发挥抗肿瘤疗效[10]，但因水溶性差、生物利用度低，导致临床应用效果受限[11]。研究[12-13]表明，**1** 和 **2** 联合给药能通过 DNA 损伤和通路抑制双重途径发挥协同作用，显著提升肿瘤细胞的凋亡率，从而增强其抗肿瘤疗效。

脂质体可同时包裹脂溶性和水溶性药物，具有生物相容性良好、制备工艺简单、负载灵活和表面易修饰等特性，并可通过 EPR 效应被动靶向至肿瘤组织。DSPE-PEG_{2000} 具有延长半衰期、增强稳定性、PEG 末端易修饰等优势，是常用的脂质体组成材料之一[14]。

本研究设计了 TPP 修饰的共载 **1** 和 **2** 脂质体（TPP-**1**/**2**-Lip），将 **1** 和 **2** 分别包载于脂质体的亲水性和亲脂性区域。这种设计是为了使 TPP-**1**/**2**-Lip 先通过被动靶向作用在肿瘤组织富集，再通过 TPP 靶向至线粒体，从而提升药物的生物利用度，降低其毒性。这种层级靶向递药系统可为 BC 的精准治疗提供新策略。

1　仪器与试药

JY922D 型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；RE52CS 型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；FA1004 型电子分析天平（上海越平科学仪器有限公司）；0.22 μm 聚碳酸酯径迹蚀刻膜（美国 Cytiva 公司）；透析袋（截留分子量为 12 000 ～ 14 000，北京宝赛生物技术有限公司）；Zetasizer Nano-90 型纳米粒度及ζ电位分析仪（英国 Malvern 公司）；BB1502TCS 型细胞培养箱（美国 Thermo Fisher 公司）；Ti-S 型荧光倒置显微镜（日本 Nikon 株式会社）；FACSCalibur 型流式细胞仪（美国 BD 公司）。

1（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，批号 D122335，纯度≥ 90%）；胆固醇（Chol）、青链霉素双抗、Hoechst 33258 染料、EdU-555 细胞增殖检测试剂盒均购于大连美仑生物技术有限公司；**2**（成都格利普生物科技有限公司，批号 JOT-10221，纯度≥ 98%）；蛋黄卵磷脂（egg phospholipids，EPC，日本 NOF 株式会社）；DSPE-PEG_{2000}-TPP 和 DSPE-PEG_{2000}（西安瑞禧生物技术有限公司）；1640-RPMI 培养基、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒（北京索莱宝科技有限公司）；FBS（武汉赛维尔生物科技有限公司）；0.25% 胰蛋白酶（美国 Gibco 公司）；香豆素（coumarin，Cou，德国 Sigma-Aldrich 公司）；多聚甲醛、4',6- 二脒基 -2- 苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）、钙黄绿素 calcein-AM/ 碘化丙啶（propidium iodide，PI）细胞活性与细胞毒性检测试剂盒、细胞计数 Kit-8 试剂盒均购买自碧云天生物技术有限公司；Matrigel 基质胶（美国 Corning 公司）。

人膀胱癌细胞（KU-19-19 细胞）购于中国医学科学院基础医学研究所，在 37 ℃、5% CO_2 条件下，用 1640-RPMI 培养基（含 10% FBS 和 1%的青霉素链霉素）培养。

2　方法与结果

2.1　**1** 和 **2** 协同比例筛选

取生长对数期的KU-19-19细胞，以每孔1.5×10^4个

收稿日期：2026-02-04

基金项目：国家自然科学基金项目（82204629）、辽宁省科技计划联合计划（应用基础研究项目，2023JH2/101700224）

作者简介：邹乃建，主治医师，硕士，从事中西医结合治疗泌尿系统疾病的研究。

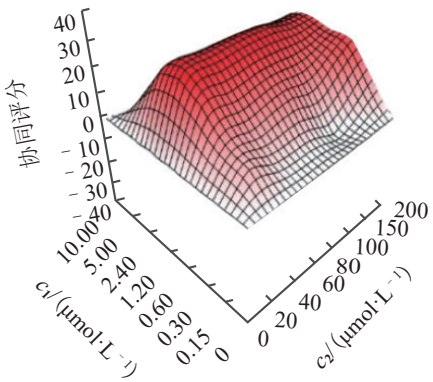
通信作者：鹿英强，副主任医师，硕士，从事中西医结合治疗泌尿系统疾病的研究。

的密度接种于 96 孔板，在 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 12 h。采用棋盘法加药。根据预试验结果，第 1 ～ 7 行分别加入终浓度为 0.15、0.3、0.6、1.2、2.4、5、10 μmol/L 的游离 **1**，第 1 ～ 7 列加入终浓度为 20、40、60、80、100、150、200 μmol/L 的游离 **2**。细胞培养 48 h 后按细胞计数试剂盒说明书操作，用酶标仪在 450 nm 处测定光密度（optical density，OD）值，评估细胞活力。采用在线 SynergyFinder 软件（https://synergyfinder.fimm.fi）通过响应面模型和零相互作用效力计算药物协同评分与“抑制指数”（抑制指数 =100 - 细胞活力）。

结果（图 1）显示，**1** 与 **2** 在抑制 KU-19-19 细胞增殖方面的协同评分为 12.99（大于 10 即表明具有强效协同作用），组合敏感度得分为 76.40。综合考虑 2 种药物的协同评分和脂质体本身的包载能力，最终选择 20 μmol/L 的 **2** 和 1.25 μmol/L 的 **1**（物质的量比为 16 ∶ 1）协同作用，并作为 TPP-**1**/**2**-Lip 的优化联合浓度比。

2.2 脂质体的制备

采用薄膜分散 - 硫酸铵水化法制备 TPP-**1**/**2**-Lip。精密称取 Chol 22 mg、EPC 4 mg、DSPE-PEG_{2000} 2 mg、DSPE-PEG_{2000}-TPP 2 mg、**2** 0.50 mg，用甲醇 5 mL 溶解，置 50 mL 圆底烧瓶中，超声（200 W，40 kHz）混匀，于 40 ℃水浴中减压旋蒸，直至形成一层类脂薄膜；随后，加入 250 mmol/L 硫酸铵水溶液 5 mL，



注：绿色表示两药拮抗，红色表示两药协同。

图 1　1 和 2 协同比例筛选（n=3）

Fig.1　Screening for Synergistic Ratios of **1** and **2** (n=3)

室温轻摇至类脂薄膜完全水合溶解。将混悬液转移至 10 mL EP 管中，于冰水浴中超声（200 W，间隔 5 s，超声 10 s）10 min。将所得脂质体混悬液经 0.22 μm 聚碳酸酯径迹蚀刻膜挤出 2 次，使脂质体粒径均一化，随后装入透析袋中，加入 PBS（pH 7.4）500 mL，搅拌（400 r/min）下避光透析 24 h，其间每隔 8 h 更换 1 次透析液（PBS，pH 7.4）。精密称取 **1** 0.08 mg 置圆底烧瓶中，以甲醇 1 mL 溶解，于 40 ℃水浴中旋蒸去除溶剂，加入上述透析后的脂质体混悬液 5 mL，置 40 ℃水浴中振摇 20 min，即得 TPP-**1**/**2**-Lip。

按上述制备方法，除不加入 DSPE-PEG_{2000}-TPP 外，其余步骤相同，制备非靶向脂质体（**1**/**2**-Lip），以及单药脂质体（**1**-Lip 和 **2**-Lip）。另外，不加入 DSPE-PEG_{2000}-TPP、**1**、**2**，其余步骤相同，制备空白纳米脂质体。由于 **1** 和 **2** 均不具有荧光，因此在进行肿瘤细胞对脂质体的摄取试验时，将药物替换为具有荧光的 Cou，同法制备 TPP-Cou-Lip 和 Cou-Lip。

2.3 脂质体处方优化

采用 Box-Behnken 设计结合响应面法优化脂质体处方。基于文献[15]和预试验结果，选择能显著影响脂质体包封率的 Chol 与 EPC 质量比（*A*），Chol 与药物总量质量比（*B*），水化时间（*C*）为考察因素，以 **1** 和 **2** 的综合包封率（*Y*，即 **1** 和 **2** 包封率的平均值）为指标优化处方。

1 和 **2** 的包封率采用 HPLC 法测定。取制备的纳米脂质体 1 mL，与甲醇 4 mL 混合，精密称定，超声（400 W，5 min）辅助破乳，静置 30 min，再次精密称定，用甲醇补足损失的质量；随后，离心（7 800×*g*）3 min，取上清液进样检测，计算包封率。

色谱条件：色谱柱 C_{18} 反相柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；柱温 30 ℃；流速 1 mL/min；进样量 20 μL。检测 **1** 时：流动相 乙腈和 0.02 mol/L 磷酸二氢钠溶液（含 0.45% 三乙胺，pH 4.0），等度洗脱（体积比 32 ∶ 68）；检测波长 233 nm。检测 **2** 时：流动相 乙腈和 0.1% 磷酸，等度洗脱（体积比 66 ∶ 34）；检测波长 210 nm。

利用 Design-Expert V 8.0.6.1 软件设计试验方

案，按“**2.2**”项下方法制备不同处方的脂质体。具体因素水平、试验方案和评价结果如表 1、2 所示。对数据进行多元回归拟合，所得方程为 Y=83.37 - 1.39A+1.34B+5.31C - 1.14AB+0.37AC+0.87BC - 6.39A^2 - 7.55B^2 - 6.71C^2，R = 0.994 5。方差分析结果表明，A、B、C、A^2、B^2、C^2 均能显著影响 Y(P<0.05)，而交叉项 AB、AC、BC 对 Y 无显著影响 (P>0.05)，并且该模型可用于优化 TPP-**1**/**2**-Lip 处方。

表 1　Box-Behnken 设计的因素与水平

Tab.1　Factors and Levels for Box-Behnken Design

水平	因素		
	A	*B*	*C*/min
- 1	1 ∶ 1	10 ∶ 1	20
0	1 ∶ 2	20 ∶ 1	40
1	1 ∶ 3	30 ∶ 1	60

表 2　试验方案与包封率结果

Tab.2　Experimental Scheme and Encapsulation Rate Results

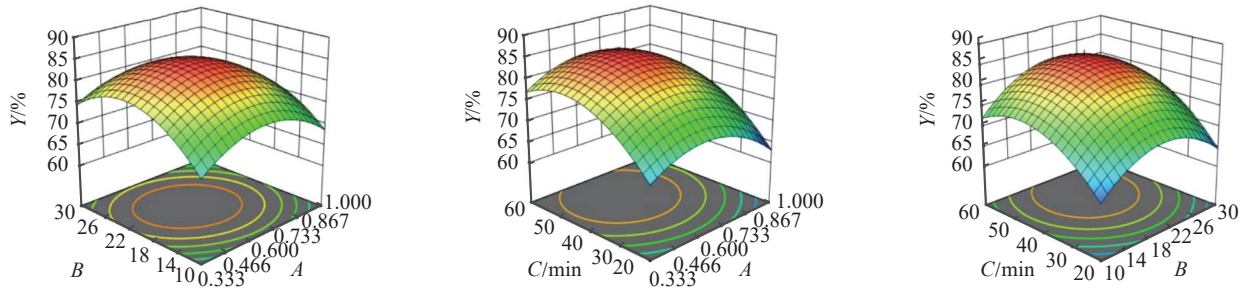
序号	*A*	*B*	*C*	*Y*/%
1	0	0	0	82.77
2	- 1	1	0	73.89
3	- 1	0	1	75.37
4	- 1	- 1	0	69.37
5	1	- 1	0	67.23
6	0	- 1	1	72.37
7	0	0	0	82.93
8	1	0	- 1	64.42
9	1	1	0	67.18
10	0	1	1	77.23
11	0	0	0	83.16
12	- 1	0	- 1	66.28
13	0	- 1	- 1	62.72
14	0	1	- 1	64.09
15	0	0	0	82.99
16	0	0	0	84.98
17	1	0	1	74.98

各因素的响应面图如图 2 所示。以 Y 最大为目标，得 TPP-**1**/**2**-Lip 优化处方参数为：A 0.317，B 10.596，水化时间 48.008 min。此条件下的预测综合包封率为 84.58%。结合本课题组前期研究经验，对上述优化处方进行小范围调整，确定 TPP-**1**/**2**-Lip 的最终处方为 EPC 19 mg、Chol 6 mg、DSPE-PEG_{2000} 2 mg、DSPE-PEG_{2000}-TPP 2 mg、**2** 0.50 mg、**1** 0.07 mg、水化时间为 50 min，水化温度为 40 ℃，处方量为 5 mL。

按优化处方平行制备 3 批脂质体（每批处方量均为 5 mL），并测定 TPP-**1**/**2**-Lip 的包封率。结果显示，**2** 的包封率为 (87.16±1.78) %，**1** 的包封率为 (83.14±0.98) %，综合包封率为 (85.15±1.21) %，与预测值的误差小于 5%，表明该模型合理、方法可行。

2.4　脂质体理化性质表征

使用纳米粒度及 ζ 电位分析仪检测 4 ℃时 TPP-**1**/**2**-Lip 的粒径、PDI 和 ζ 电位，并考察其在 4 ℃放置 35 d 后粒径和 PDI 的变化，以评价脂质体的贮存稳定性。结果显示，以优化处方制备的 3 批 TPP-**1**/**2**-Lip 的平均粒径为 (74.30±2.71) nm，PDI 为 0.07±0.02，ζ 电位为 (0.4±0.17) mV，提示其粒度均匀。TPP-**1**/**2**-Lip 在 4 ℃放置 35 d，粒径无明显变化，提



A　　B　　C

A—A、B 对 Y 的影响；B—A、C 对 Y 的影响；C—B、C 对 Y 的影响。

图 2　各因素对包封率影响的效应面图

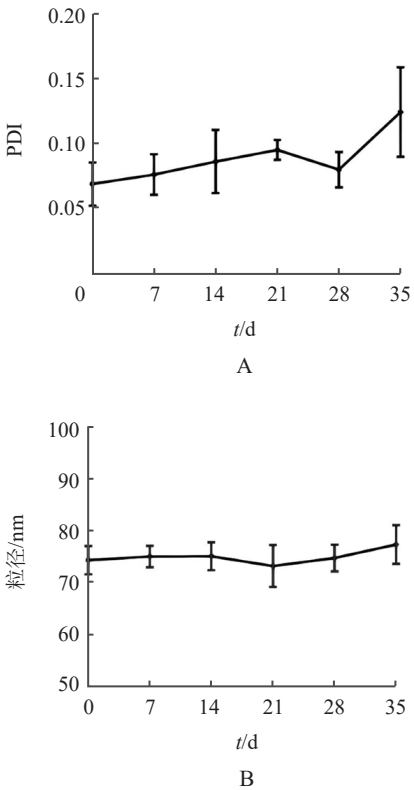
Fig.2　Response Surface Plots of the Effects of Various Factors on the Encapsulation Efficiency

示其贮存稳定性良好（图3）。

2.5 细胞摄取试验

取对数生长期的KU-19-19细胞，以每孔1×10^4个的密度接种于48孔板，于37 ℃、5% CO_2条件下培养24 h，分别添加Cou-Lip和TPP-Cou-Lip（Cou浓度均为2 μmol/L），每孔50 μL。另以空白纳米脂质体为空白对照。分别于培养1、2、4 h时吸取培养基，用PBS洗涤（500 μL×3），4%多聚甲醛固定15 min后经DAPI避光染色15 min，用荧光显微镜观察并拍照，用ImageJ 1.53q软件定量计算荧光强度。另取KU-19-19细胞，以每孔3×10^5个的密度接种到6孔板，于37 ℃、5% CO_2条件下培养过夜，分别加入2 μmol/L的Cou-Lip和TPP-Cou-Lip，于培养1、2、4 h时用PBS洗涤（500 μL×3），每孔加入胰蛋白酶200 μL，离心（1 500×*g*）3 min，用PBS 300 μL重悬，用流式细胞仪分析。

结果（图4）显示，TPP-Cou-Lip组的绿色荧光强度显著高于Cou-Lip组，表明TPP修饰可显著促进脂质体在KU-19-19细胞中的摄取。流式细胞分析法测得的各组KU-19-19细胞中的Cou荧光强度变化特征，与荧光显微镜观察结果一致。



A—PDI；B—粒径。

图3 TPP-1/2-Lip在4 ℃的贮存稳定性（*n*=3）

Fig.3 Storage Stability of TPP-**1**/**2**-Lip at 4 ℃（*n*=3）

2.6 活/死细胞染色试验

取对数生长期的KU-19-19细胞，以每孔1.5×10^4个的密度接种于96孔板，于37 ℃、5% CO_2条件下培养过夜，每孔加入不同的载药纳米脂质体（**1**-Lip、**2**-Lip、**1**/**2**-Lip、TPP-**1**/**2**-Lip，控制**1**和**2**终浓度分别为1.1和17.6 μmol/L，**1**/**2**-Lip和TPP-**1**/**2**-Lip按上述比例共载）或空白纳米脂质体20 μL，培养48 h，然后用含有0.2 μmol/L钙黄绿素和2.5 μmol/L PI的PBS（pH 7.4）替换培养基，每孔100 μL，37 ℃避光孵育30 min，经PBS 200 μL洗涤后用荧光显微镜观察并拍照（图5）。

细胞死亡率统计结果（图6A）显示，除空白对照组外，各制剂处理组对细胞活力均有一定的抑制作用，**1**/**2**-Lip处理组相较于2个单药组在抑制KU-19-19细胞活力方面具有显著性差异，证实两药具有协同作用；与**1**/**2**-Lip相比，TPP-**1**/**2**-Lip对KU-19-19细胞活力的抑制效果更强，可能是TPP修饰使脂质体具备了对KU-19-19细胞线粒体的主动靶向作用。

2.7 细胞凋亡试验

取对数生长期的KU-19-19细胞，以每孔3×10^5个接种于6孔板，于37 ℃、5% CO_2条件培养过夜，每孔分别加入不同的载药纳米脂质体（同“**2.6**”项）200 μL，继续培养24 h。吸出培养基，剩余物用PBS 1 mL洗涤，每孔加入无EDTA的胰蛋白酶250 μL，离心后取剩余物，按细胞凋亡检测试剂盒说明书进行染色，用流式细胞仪检测，并按下式计算细胞凋亡率（apoptosis rate，AR）。

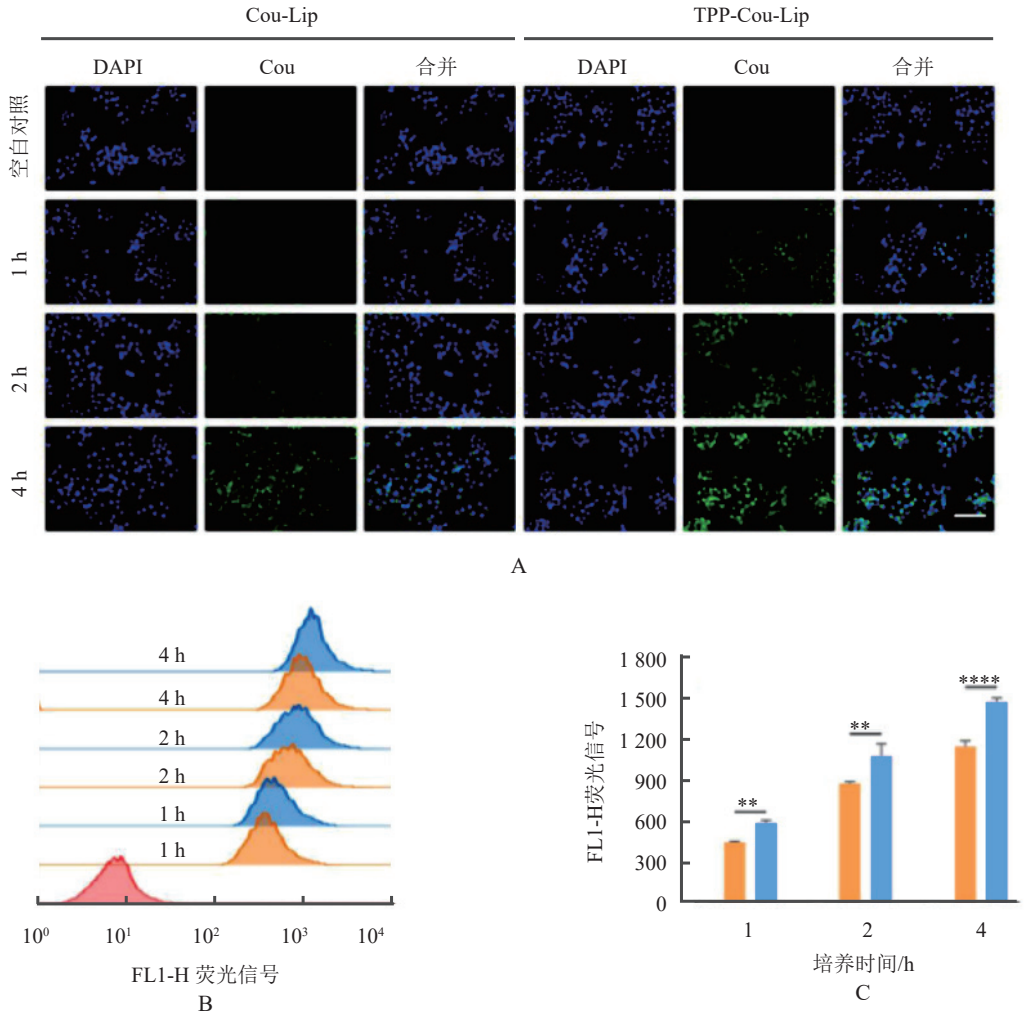
$$AR=A_1/A_0\times100\%$$

式中：A_1和A_0分别表示凋亡细胞数量和细胞总数。

结果（图6B和7）显示，TPP-**1**/**2**-Lip处理组的细胞凋亡率显著高于其他组别（$P<0.001$），表明TPP-**1**/**2**-Lip能有效诱导膀胱癌细胞凋亡。

2.8 细胞增殖试验

取对数生长期的KU-19-19细胞，以每孔1×10^4个

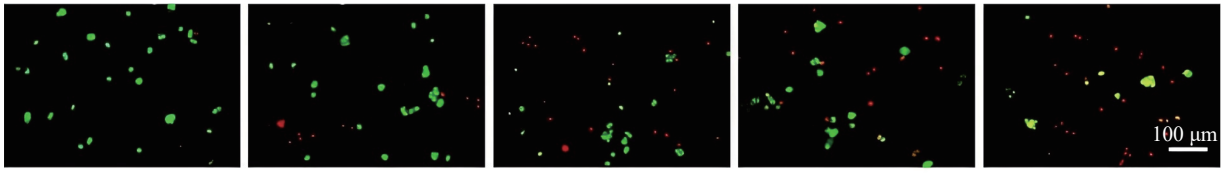


A—荧光显微图像（比例尺为 100 μm）；B—流式细胞仪测得的 KU-19-19 细胞摄取不同脂质体后的荧光强度；C—流式细胞仪测得的荧光强度统计柱状图（** 表示 $P<0.01$，**** 表示 $P<0.000\ 1$；$n=3$）。

■—空白对照组；■—Cou-Lip 处理组；■—TPP-Cou-Lip 处理组。

图 4　KU-19-19 细胞与不同纳米脂质体孵育后的摄取和细胞内分布

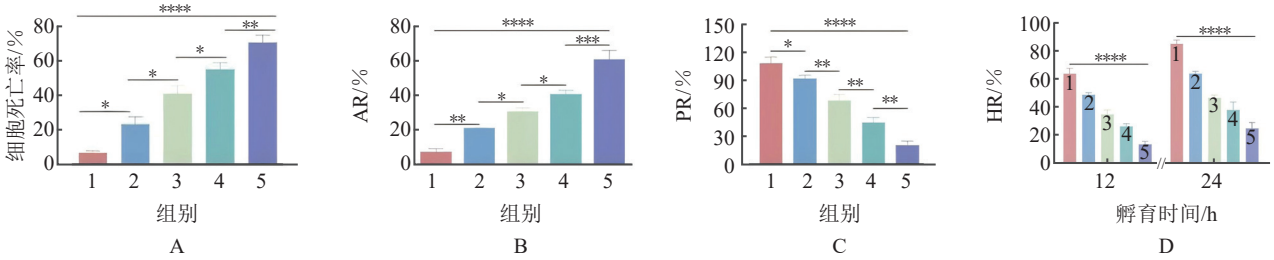
Fig.4　Cellular Uptake and Intracellular Distribution of Different Nanoliposomes in KU-19-19 Cells after Incubation



1—空白对照组；2—**2**-Lip 处理组；3—**1**-Lip 处理组；4—**1**/**2**-Lip 处理组；5—TPP-**1**/**2**-Lip 处理组。

图 5　经不同纳米脂质体处理后 KU-19-19 细胞的荧光显微图像（比例尺为 100 μm）

Fig.5　Fluorescence Microscopic Images of KU-19-19 Cells after Treatment with Different Nanoliposomes (Scale Bar: 100 μm)



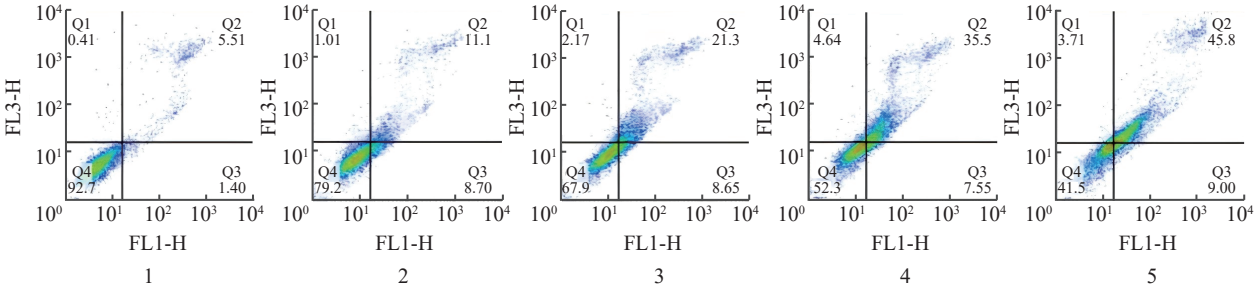
注：两两比较，* 表示 P<0.05，** 表示 P<0.01，*** 表示 P<0.001，**** 表示 P<0.000 1；n=3。

A—活 / 死细胞染色试验定量结果；B—细胞凋亡率；C—细胞增殖率；D—划痕愈合率。

1—空白对照组；2—**2**-Lip 处理组；3—**1**-Lip 处理组；4—**1**/**2**-Lip 处理组；5—TPP-**1**/**2**-Lip 处理组。

图 6　不同纳米脂质体处理后 KU-19-19 细胞的细胞活力

Fig.6　Cell Viability of KU-19-19 Cells after Treatment with Different Nanoliposomes



1—空白对照组；2—**2**-Lip 处理组；3—**1**-Lip 处理组；4—**1**/**2**-Lip 处理组；5—TPP-**1**/**2**-Lip 处理组。

图 7　不同纳米脂质体诱导 KU-19-19 细胞凋亡的流式细胞分析结果

Fig.7　Flow Cytometric Analysis of Apoptosis Induced by Different Nanoliposomes in KU-19-19 Cells

的密度接种于 48 孔板，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养至 70%融合，每孔添加不同的载药纳米脂质体（**1**-Lip、**2**-Lip、**1**/**2**-Lip、TPP-**1**/**2**-Lip，控制 **1** 和 **2** 终浓度为 0.56 和 9.0 μmol/L，**1**/**2**-Lip 和 TPP-**1**/**2**-Lip 按上述比例共载）和空白纳米脂质体 50 μL，孵育 5 h。参照 EdU-555 细胞增殖检测试剂盒说明书操作，用荧光显微镜观察并拍照，并按下式计算细胞增殖率（proliferation rate，PR）。

$$PR=A_E/A_T\times100\% \quad ④$$

式中：A_E 和 A_T 分别代表 EdU 阳性细胞数和细胞总数。

结果（图 6C 和 8）显示，TPP-**1**/**2**-Lip 对 KU-19-19 细胞的增殖抑制作用较显著，PR 降至空白对照组的约 1/3，且显著低于单药脂质体及未修饰双药脂质体（P<0.01）。

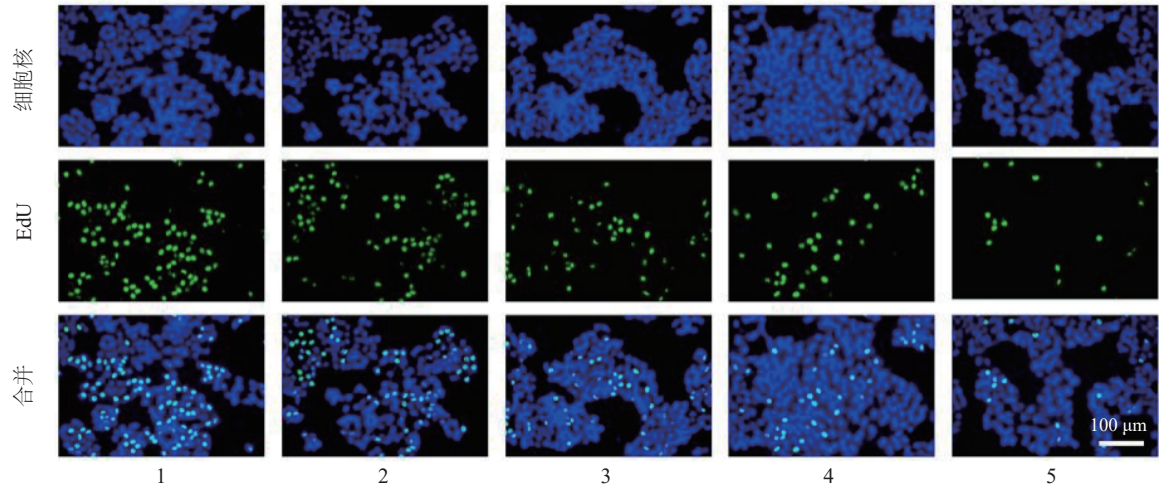
2.9　细胞划痕试验

取对数生长期的 KU-19-19 细胞，以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养至 80%融合时，用无菌枪头划痕，再用 PBS 1 mL 洗涤，加入含不同纳米脂质体的培养基（纳米脂质体 200 μL+ 新鲜培养基 1 800 μL），继续孵育。分别于 0、12、24 h 时用荧光倒置显微镜观察并拍照，用 ImageJ 1.53q 软件对划伤区域进行定量分析，并按下式计算伤口愈合率（healing rate，HR）。

$$HR=(1-S_t/S_0)\times100\% \quad ⑤$$

式中：S_t 和 S_0 分别表示在 0 h、t 时刻测得的伤口面积。

结果（图 6D 和 9）显示，TPP-**1**/**2**-Lip 对 KU-19-19 细胞的迁移能力具有显著抑制作用。24 h 时，空白对照组划痕区已愈合 80%以上，而 TPP-**1**/**2**-Lip

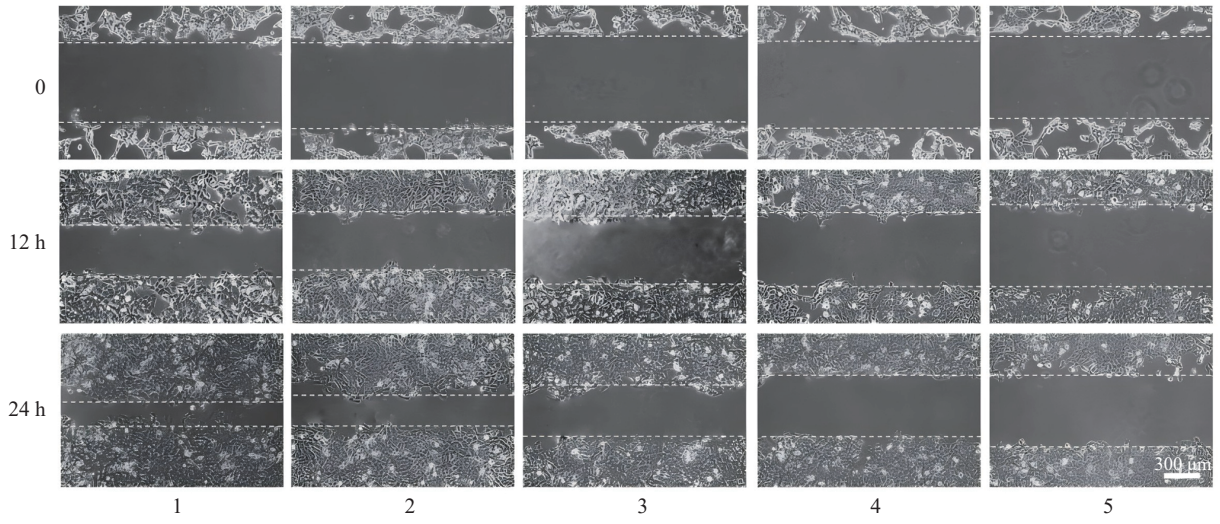


注：EdU 为 5- 乙炔基 -2'- 脱氧尿嘧啶核苷。

1—空白对照组；2—**2**-Lip 处理组；3—**1**-Lip 处理组；4—**1**/**2**-Lip 处理组；5—TPP-**1**/**2**-Lip 处理组。

图 8　不同纳米脂质体处理后 KU-19-19 细胞的细胞增殖结果（比例尺为 100 μm）

Fig.8　Cell Proliferation Results of KU-19-19 Cells after Treatment with Different Nanoliposomes (Scale Bar: 100 μm)



1—空白对照组；2—**2**-Lip 处理组；3—**1**-Lip 处理组；4—**1**/**2**-Lip 处理组；5—TPP-**1**/**2**-Lip 处理组。

图 9　不同纳米脂质体处理后 KU-19-19 细胞的划痕愈合情况（比例尺为 300 μm）

Fig.9　Wound Healing Assay of KU-19-19 Cells after Treatment with Different Nanoliposomes (Scale Bar: 300 μm)

处理组愈合面积约 20%，且抑制作用显著高于单药脂质体及 **1**/**2**-Lip 处理组（P<0.000 1）。

2.10　血管生成拟态（vasculogenic mimicry，VM）抑制试验

将 20 μL 的无菌移液管头、EP 管、96 孔板于 4 ℃预冷。取基质胶，每孔 50 μL 加至预冷的 96 孔板中，于 37 ℃凝固 30 min。取 KU-19-19 细胞，以每孔 1.5×10^4 个的密度接种于上述 96 孔板中，分别加入不同的载药纳米脂质体（**1**-Lip、**2**-Lip、**1**/**2**-Lip、TPP-**1**/**2**-Lip，控制 **1** 和 **2** 终浓度为 0.44 和 7.0 μmol/L，**1**/**2**-Lip 和 TPP-**1**/**2**-Lip 按上述比例共载）或空白纳米脂质体 20 μL。培养 4 h 时用倒置显微镜观察各纳米脂质

体对 VM 的抑制情况，用 ImageJ 1.53q 软件统计 VM 的节点、连接点、分支和段的数量。

结果（图 10）显示，空白对照组形成了明显的网状 VM 通道，节点、连接点、分支及段的数量均最多；而 TPP-**1**/**2**-Lip 处理组几乎看不到完整的环状结构，血管呈“断线”状。这说明 TPP-**1**/**2**-Lip 对 VM 通道具有显著抑制效果。

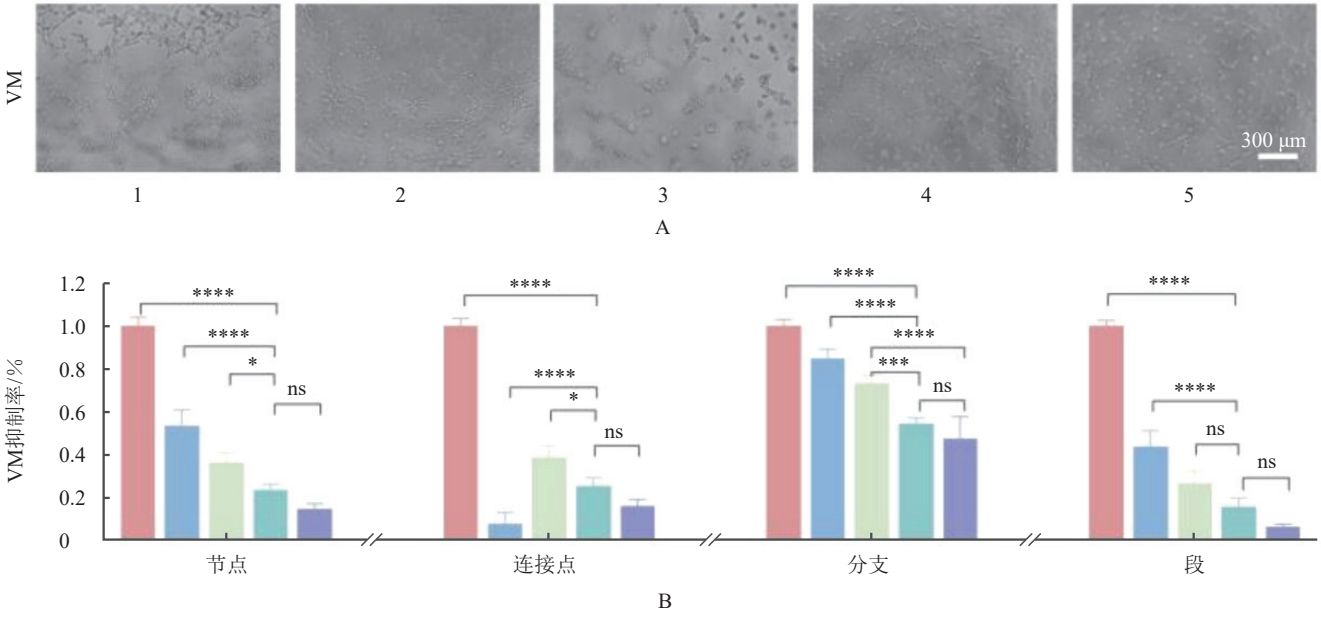
3 总结与讨论

本研究构建的线粒体靶向脂质体 TPP-**1**/**2**-Lip，通过将 **1** 包载于亲水性内腔、**2** 嵌入脂质双分子层，实现了双药共递送。纳米脂质体的载药性能受脂质组成、制备工艺及药物性质等多重因素影响。胆固醇与磷脂的比例与双分子层刚性相关，该比例过高会破坏膜完整性，过低则易导致药物渗漏；水化时间决定脂质膜从玻璃态向液晶态的相转变程度；DSPE-PEG_{2000} 的引入不仅提升了脂质体的空间稳定性与长循环能力，其末端修饰的 TPP 基团也为线粒体靶向提供了结构基础。脂质体与肿瘤细胞的相互作用主要依赖于内吞途径，而 TPP 作为亲脂性阳离子，可利用肿瘤细胞的线粒体膜电位差实现主动富集，进而显著增强药物在细胞内的蓄积与线粒体定位能力。同时，递送的 **1** 和 **2** 可以协同发挥 DNA 损伤和通路阻断作用：**1** 通过嵌入 DNA 并抑制拓扑异构酶 Ⅱ，诱发 DNA 断裂[16]；**2** 则阻断 PI3K/Akt 信号通路[17]，削弱肿瘤细胞的凋亡逃逸能力；二者协同，可显著提升肿瘤细胞凋亡率。体外试验中 12.99 的评分结果也进一步证实了该协同效应。后续研究将结合内吞抑制剂、体内分布及机制通路分析，进一步揭示该递送系统与肿瘤细胞的互作机制，为优化靶向联合治疗策略提供更深入的理论依据。

参考文献：

[1] Huang P, Wang J, Yu Z Z, *et al*. Redefining bladder cancer treatment: innovations in overcoming drug resistance and immune evasion[J]. *Front Immunol*, 2025, **16**: 1537808.

[2] Sanguedolce F, Zanelli M, Palicelli A, *et al*. HER2 expression in bladder cancer: a focused view on its diagnostic, prognostic,



A—细胞显微图像（比例尺为 300 μm）；B—不同纳米脂质体对 KU-19-19 细胞 VM 的抑制率（两两比较：ns 表示 P>0.05，* 表示 P<0.05，*** 表示 P<0.001，**** 表示 P<0.000 1；n=3）。

1—空白对照组（■）；2—**2**-Lip 处理组（■）；3—**1**-Lip 处理组（■）；4—**1**/**2**-Lip 处理组（■）；5—TPP-**1**/**2**-Lip 处理组（■）。

图 10 不同纳米脂质体对 KU-19-19 细胞 VM 通道形成的抑制作用（n=3）

Fig.10 Inhibition of Different Nanoliposomes on VM Channel Formation of KU-19-19 Cells (n=3)

and predictive role［J］. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(4): 3720.

［3］ 马晓宇, 蔡宏宙, 徐维章, 等. 膀胱癌HER2靶向治疗的研究进展[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2024, **16**(6): 614-619.

［4］ Koch G E, Smelser W W, Chang S S. Side effects of intravesical BCG and chemotherapy for bladder cancer: what they are and how to manage them［J］. *Urology*, 2021, **149**: 11-20.

［5］ 邓楚夏, 刘俊峰, 卢懿, 等. 用于治疗膀胱癌的局部灌注药物及新型给药系统的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(7): 1026-1033.

［6］ Tang T Y, Huang X, Zhang G, *et al*. Advantages of targeting the tumor immune microenvironment over blocking immune checkpoint in cancer immunotherapy［J］. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, **6**(1): 72.

［7］ Wang S Y, Guo F, Ji Y H, *et al*. Dual-mode imaging guided multifunctional theranosomes with mitochondria targeting for photothermally controlled and enhanced photodynamic therapy *in vitro* and *in vivo*［J］. *Mol Pharm*, 2018, **15**(8): 3318-3331.

［8］ 陈毅. R8修饰柔红霉素与和厚朴酚脂质体的制备及抗肿瘤活性研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2022.

［9］ Ippoliti G, Casirola G, Marini G, *et al*. Letter: daunorubicin cardiotoxicity［J］. *Lancet*, 1976, **1**(7956): 430-431.

［10］ Wei W, Rasul A, Sadiqa A, *et al*. Curcumol: from plant roots to cancer roots［J］. *Int J Biol Sci*, 2019, **15**(8): 1600-1609.

［11］ 王少霞. 莪术醇纳米凝胶的制备及抗肿瘤活性评价[D]. 烟台: 烟台大学, 2023.

［12］ 王中会, 闫平慧, 晁旭. 莪术醇抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2022, **38**(6): 703-708.

［13］ Liu Y, Wang W, Di B H, *et al*. Curcumol ameliorates neuroinflammation after cerebral ischemia-reperfusion injury via affecting microglial polarization and Treg/Th17 balance through Nrf2/HO-1 and NF-κB signaling［J］. *Cell Death Discov*, 2024, **10**(1): 300.

［14］ Shah S, Dhawan V, Holm R, *et al*. Liposomes: advancements and innovation in the manufacturing process［J］. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **154/155**: 102-122.

［15］ 孔亮, 郭睿博, 张璐, 等. 甘草次酸修饰酶敏感多柔比星脂质体的处方筛选及体外靶向肝癌干细胞作用的评价[J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(10): 1459-1466.

［16］ 李丁. NF-κB/LncRNA-uc002jit.1/PARP1形成环路调节柔红霉素诱导的急性髓系白血病细胞DNA损伤修复[D]. 福州: 福建医科大学, 2019.

［17］ 李祚涛, 陈小芸, 李海亮, 等. 莪术醇通过PI3K/AKT信号通路介导急性髓系白血病细胞程序性死亡[J]. 中国实验血液学杂志, 2024, **32**(6): 1682-1688.