光敏性多西他赛脂质体的研究与抗肿瘤作用评价

张 颖[1]，许霞青[1]，何 勐[1]，张月丽[1]，杨晓瑞[1]，张振中[2]，郭新红[2]*
（1. 郑州大学附属郑州中心医院药学部，河南郑州 450000；2. 郑州大学药学院，河南郑州 450001）

摘要：采用薄膜分散法制备了共载多西他赛（**1**）和光敏剂富勒烯 C_{60} 丙二酸衍生物（**2**）的光敏性脂质体（**1-2**-LP），并考察了所得脂质体的粒径、ζ电位、外观形态、药物包封率、体外释放、体外细胞毒性，及其对光照后肿瘤细胞内活性氧物质（ROS）表达水平、肿瘤细胞周期和细胞凋亡的影响和在小鼠体内抗肿瘤的活性。结果表明，**1-2**-LP 平均粒径为（170.4±1.3）nm，ζ电位为（－31.28±1.09）mV；透射电镜表征显示该脂质体呈类球形，分布均匀；**1** 和 **2** 的包封率为（86.38±0.99）%和（93.81±1.06）%。**2** 的加入并不影响 **1-2**-LP 中 **1** 的释放，**1** 在 50 h 内累积释放率为 78%。**1-2**-LP 在光照（532 nm 激光照射 3 min）下能显著抑制人宫颈癌（HeLa）和小鼠黑色素瘤（B16-F10）细胞增殖。ROS 检测结果显示 **1-2**-LP 在光照下能使 HeLa 和 B16-F10 细胞内荧光强度明显增强。流式细胞术结果显示，**1-2**-LP 经光照后能改变细胞周期，促进细胞早期凋亡。荷 B16-F10 瘤小鼠的体内试验结果显示，**1-2**-LP 光照组小鼠的肿瘤生长被显著抑制（抑制率为 85.33%），显示出共载了 **1** 和 **2** 的脂质体结合激光照射的协同抗肿瘤作用。

关键词：光敏性脂质体；富勒烯 C_{60}；多西他赛；抗肿瘤作用；光动力疗法；化学疗法
中图分类号：R944.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)03-0335-10
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.03.009

Study and Antitumor Evaluation of Photosensitive Docetaxel Liposomes

ZHANG Ying[1], XU Xiaqing[1], HE Meng[1], ZHANG Yueli[1], YANG Xiaorui[1], ZHANG Zhenzhong[2], GUO Xinhong[2]*
(*1. Dept. of Pharmacy, Zhengzhou Central Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000;*
2. Pharmacy College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

ABSTRACT: The photosensitive liposomes co-loaded with docetaxel (**1**) and fullerene C_{60} malonic acid derivative (**2**), a photosensitizer, were constructed by thin film dispersion method. The particle size, ζ potential, appearance, encapsulation efficiency, *in vitro* release, cytotoxicity of the prepared liposomes (**1-2**-LP) were characterized. The effects on reactive oxygen species (ROS) expression, cell cycle and apoptosis of the tumor cells, and *in vivo* anti-tumor activity in mice were also performed. The results showed that the particle size and ζ potential of the **1-2**-LP were (170.4±1.3) nm and (－31.28±1.09) mV. The observation of transmission electron microscopy revealed that the product was quasi-spherical and uniform. The encapsulation efficiencies of **1** and **2** were (86.38±0.99)% and (93.81±1.06)%. The release of **1** from the **1-2**-LP was unaffected by the addition of **2**, and the cumulative release of **1** within 50 h was 78%. The **1-2**-LP could significantly inhibit the proliferations of human cervical cancer (HeLa) cells and mouse melanoma (B16-F10) cells under the irradiation of laser at 532 nm for 3 min. The detection results of ROS showed that **1-2**-LP enhanced the fluorescence intensities of HeLa and B16-F10 cells under the laser irradiation. The results of flow cytometry showed the **1-2**-LP combined with laser irradiation changed the cell cycle of the tumor cells and promoted their early apoptosis. The *in vivo* test in B16-F10 tumor-bearing mice showed that the tumor growth of the mice in **1-2**-LP combined with laser irradiation group was significantly inhibited with the inhibitory rate of 85.33%, showing a synergistic antitumor effect of the liposomes co-loaded with **1** and **2** in combination with laser irradiation.

Key Words: photosensitive liposome; fullerene C_{60}; docetaxel; antitumor effect; photodynamic therapy; chemotherapy

光动力疗法（photodnamic therapy，PDT）利用特定波长的光源照射、激发光敏剂，从而并将能量传递到基态氧，产生单线态氧等活性氧物质（reactive oxygen species，ROS），继而通过 ROS 损伤靶部位细胞的蛋白质、DNA 和细胞膜，最终导致细胞凋亡，常用于肿瘤治疗[1]。富勒烯（fullerene）C_{60} 是一种新型光敏剂，具有独特的光、电、化学和物理性能，其中最突出的生物学效应是光动力学作用，在许多医学领域的应用中都具有较大的潜力[2]，但疏水性限制了其应用。近年来，有研究显示通过化学修饰可显著提高富勒烯 C_{60} 的溶解度和生物相容性，此类衍生物已经在介导体内外 PDT 方面得到进一步研究[3]。

多西他赛（docetaxel，**1**）又名多烯紫杉醇，已被广泛用于治疗乳腺癌、非小细胞肺癌、胃癌和卵巢癌等恶性肿瘤[4]，目前上市剂型为注射液，多采用 Tween-80 和乙醇做助溶剂以增加溶解性，然而在应用过程中会出现皮疹、呼吸困难及低血压等不良反应[5]。因此，近年来多项研究致力于 **1** 的新剂型研发以实现低毒性、少不良反应、高效和强靶向性。已有研究表明脂质体具有缓释、靶向性等特点，可将抗肿瘤药物包埋在内核或分散在载体中，在水中形成类似胶体的溶液，提高生物利用度、减少不良反应[6]。

本研究拟将 PDT 和化学药物疗法联用，协同增强抗肿瘤作用，克服单独化疗存在的不足，为肿瘤治疗提供新思路。以 **1** 和光敏剂富勒烯 C_{60}- 丙二酸衍生物（C_{60}-DMA，**2**）为模型药，构建光敏性脂质体 **1-2**-LP，实现二者共载，并考察了 **1-2**-LP 的制剂学特征，评价了光敏剂 **2** 在体外产生 ROS 的能力、对药物释放的影响，以及该制品的体内外抗肿瘤作用。

收稿日期：2021-08-20

基金项目：国家自然科学基金面上项目（81273451）、河南省科技攻关项目计划（212102310121）、中国药学会科普研究项目（CMEI2021KPYJ00256）

作者简介：张　颖（1989—），女，硕士研究生，专业方向：光疗与化疗相结合抗肿瘤。

通信作者：郭新红（1973—），女，博士，副教授，从事肿瘤靶向治疗药物剂型的研究。

E-mail：gxh371@zzu.edu.cn

1　仪器与试药

AR124CN 型电子天平（奥豪斯仪器上海有限公司）；RE-52AA 型旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；Nano-ZS90 型激光纳米粒度分析仪（英国马尔文公司）；ECLIPSE 80i 型荧光显微镜（日本 Nikon 公司）；医用净化工作台（苏州市冯氏实验动物设备有限公司）；E191 型 CO_2 培养箱（美国 SIM 公司）；BH-2 型荧光倒置显微镜（日本 Olympus 公司）；Synergy HI 酶标仪（美国 Biotek 公司）；UV-2550 型紫外 - 可见分光光度计（日本 Shimadzu 公司）；HT7800 型透射电镜［日立科学仪器（北京）有限公司］；Attune CytPix 型流式细胞仪（美国赛默飞世尔科技公司）。

富勒烯 C_{60}（濮阳市永新富勒烯科技有限公司，含量 > 95%）；**1** 原料药（北京怡禾生物工程有限公司，含量 >99%，批号 120826）；大豆磷脂和磺酰罗丹明 B（SRB）（美国 Sigma 公司）；胆固醇（天津市博迪化工有限公司）；浓盐酸（分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司）；溴化钾（光谱纯，上海研拓生物科技有限公司）；0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4，郑州创生生物工程有限公司）；RPMI 1640 培养基（北京索莱宝科技有限公司）；ROS 检测试剂盒（碧云天生物技术研究所）；荧光素标记的膜联蛋白 -V 探针（Annexin V-FITC）/ 碘化丙啶（PI）双染细胞凋亡检测试剂盒（南京凯基生物有限公司）。

人宫颈癌（HeLa）细胞和小鼠黑色素瘤（B16-F10）细胞（中国科学院细胞库）。

C57BL/6 小鼠［雄性，5 ～ 6 周龄，18 ～ 22 g，河南省实验动物中心提供，合格证号 SCXK（豫）2010-0002］。

2　方法与结果

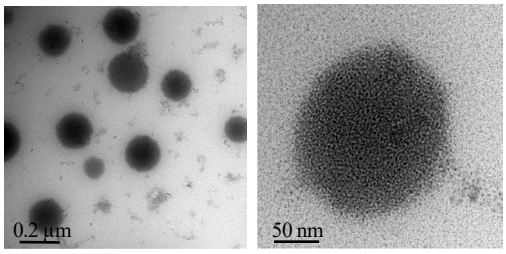
2.1　**1-2**-LP 的制备

通过查阅脂质体制备的相关文献和预试验结果，本研究选用薄膜分散法制备 **1-2**-LP[7—8]。精密称取大豆磷脂 160 mg、胆固醇 40 mg 和 **1** 8 mg，溶于乙醚和氯仿（1 ∶ 1）15 ml 中，45 ℃恒温搅拌 1 h。然后于 40 ℃水浴中减压旋蒸除去有机溶剂形成一层致密的薄膜，再加入含有 **2** 的 PBS 4 ml，使薄膜脱落，继续水化 30 min，即得 **1-2**-LP。采用同样的方法制备 **1**-LP 及空白 LP。

2.2　**1-2**-LP 的表征

通过透射电镜观察脂质体的外观形态，结果见图 1。可见，**1-2**-LP 呈类球形，粒径大小接近

170 nm，且粒径大小分布均匀。采用激光纳米粒度分析仪（检测温度 25.1 ℃，循环次数 1 次）测得 **1-2**-LP 的粒径和ζ电位为 (170.4±1.25) nm 和 (－31.28±1.09) mV（n=3），分布范围见图 2。从结果上看，2 种方法测得的粒径结果相近。



A：整体图；B：局部放大图

图 1 1-2-LP 的透射电镜照片（×7 000）

Fig.1 TEM Images of **1-2**-LP (×7 000)

2.3 药物包封率的测定

2.3.1 色谱条件

结合文献报道[9]，设定 **1** 的色谱条件：色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C_{18} 柱 (4.6 mm×150 mm，5 μm)；流动相 甲醇：水 (75 ∶ 25)；检测波长 230 nm；柱温 30 ℃；流速 1 ml/min；进样量 10 μl。方法学验证结果显示，本法专属性较高，日内和日间 RSD 均小于 2%。

另采用紫外 - 可见分光光度计全波长扫描检测 **2**，结果显示 **2** 没有单一峰的强吸收，可排除制剂成分的紫外干扰。在检测波长 340 nm、室温下检测，日内和日间 RSD 均小于 2%。

2.3.2 药物包封率的测定

参照文献采用超滤法测定包封率[10]。预试验表明，采用超滤法测定时 **1**、**2** 的平均回收率分别达 95.79 %、95.59 %，平均 RSD 分别为 0.45 %、0.23%，说明可采用超滤法测定包封率。

取 **1-2**-LP 1 ml，加甲醇稀释破乳，涡旋 3 min，再离心 (18 080×g) 10 min，取上清液照“**2.3.1**”项下色谱条件测定，计算脂质体中 **1** 的总量；另取 **1-2**-LP 1 ml，置超滤管（截留分子量 30 000）中，离心 (18 080×g) 30 min，收集续滤液照“**2.3.1**”项下色谱条件测定，计算脂质体中游离 **1** 的量，再计算包封率。采用同样的方法，使用紫外分光光度计在 340 nm 处测定脂质体中 **2** 的总量和游离量，并计算包封率。结果表明，**1-2**-LP 中 **1** 和 **2** 的包封率为 (86.38±0.99) %和 (93.81±1.06) %（n=5），均较高。

2.4 脂质体的体外释放度测定

采用动态透析袋法测定脂质体中 **1** 和 **2** 的体外累积释放率。取含等量 **1** 的 **1**-LP、**1-2**-LP 和 **1** 甲醇溶液 (2 ml)，分别置透析袋（截留分子量 8 000 ～ 14 000）中，扎紧后置含有 0.5 % Tween-80 的 PBS（释放介质）20 ml 中，然后立即置 37 ℃恒温摇床中以 75 r/min 的速度持续振摇。在每个设定的时间点取出透析液 1 ml（同时补充同温等量释放介质）。将取出的透析液离心，收集续滤液，采用 HPLC 法测定 **1** 浓度，计算脂质体的累积释放率。体外释放曲线见图 3。

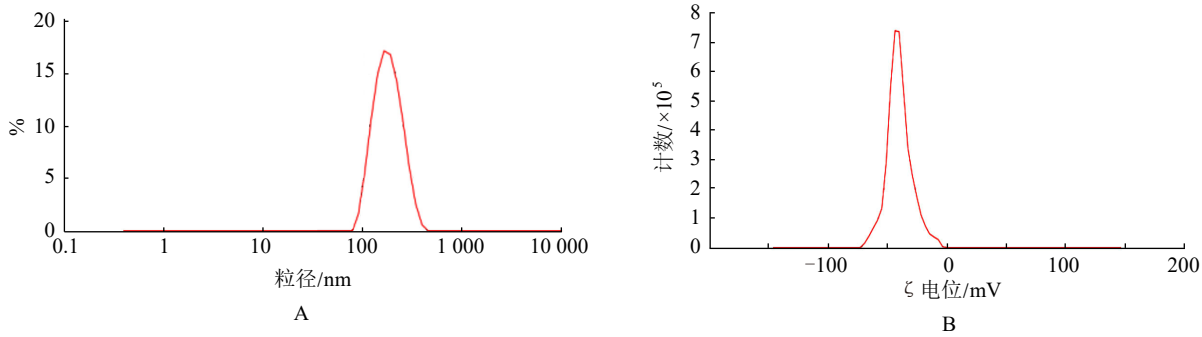


图 2 1-2-LP 的粒径（A）和ζ电位（B）分布图

Fig.2 Distributions of Particle Size (A) and ζ Potential (B) of **1-2**-LP

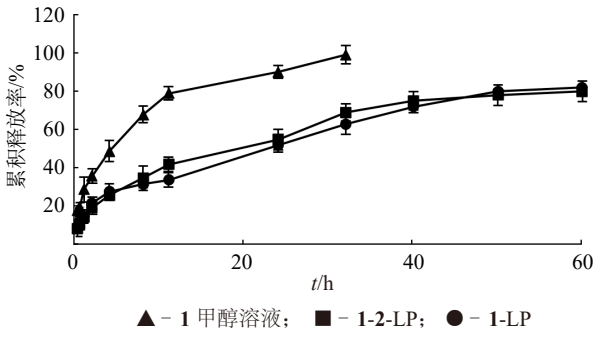


图 3　1 的体外释药曲线（*n*=3）

Fig.3　*In vitro* Release Profiles of **1**（*n*=3）

在含有 0.5% Tween -80 的 PBS 中，24 h 内 **1** 甲醇溶液组累积释放率约 90%，几乎释放完全；**1**-LP 组和 **1-2**-LP 组 50 h 内 **1** 累积释放率分别为 80%和 78%，并达到释放平台期。与 **1** 原料药相比，2 种脂质体在释放介质中 **1** 的释放均较为缓慢，说明脂质体具有一定的缓释作用。**1**-LP 与 **1-2**-LP 的释放曲线基本重合，说明 **2** 的加入并不影响 **1** 的释放。**1** 从 LP 中释放的数据用 Ritger-Peppas 模型拟合的效果较优（相关系数达到 0.998 5）。同时采用同样的方法，考察了 **2** 的释放情况，**2** PBS 溶液在 24 h 内几乎完全释放，**1-2**-LP 中的 **2** 在 60 h 内的累积释放率为 82%，与原料药相比，说明 LP 能够显著延长 **2** 的释放时间，起到缓释作用，可以用 Higuchi 模型描述释放行为（相关系数为 0.998 0）。

2.5　1-2-LP 的体外细胞毒作用及作用机制

2.5.1　1-2-LP 的体外细胞毒作用

分别取对数生长期的 HeLa 和 B16-F10 细胞，以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板中，继续培养 24 h 后，更换成含有药物的培养基进行细胞毒性试验。分别设置含不同质量浓度（0.001、0.005、0.01、0.05、0.1 μg/ml）**1** 的 **1**-LP、**1-2**-LP 避光（避光条件：采用不透光的黑色卡纸进行遮盖）组、**1-2**-LP 光照（光照条件：532 nm 激光照射 3 min[11]）组、空白 LP 组和阴性空白细胞对照组。继续培养 48 h 后，每孔缓慢加入预冷至 4 ℃的 10%三氯乙酸溶液 50 μl，静置 5 min 后将细胞板移至 4 ℃环境放置 1 h，再用超纯水洗 5 遍。在避光条件下，向每孔加入配好的 4% SRB 溶液[12]，避光染色 30 min 后弃去 SRB 染液，剩余物再用现配的 1%乙酸溶液洗涤 5 遍，加入三羟甲基氨基甲烷（Tris）碱溶液使已结合的 SRB 溶解。用酶标仪测定每孔在 565 和 690 nm 处的 OD 值，按下式计算抑制率，以及细胞半数抑制浓度（IC_{50}）值。

$$抑制率=(1-\frac{试验组OD值-空白OD值}{对照组OD值-空白OD值})\times100\%$$

细胞毒性结果如图 4 所示，与 **1**-LP 及 **1-2**-LP 避光组相比，**1-2**-LP 光照组对 HeLa 和 B16-F10 细胞的抑制作用明显更强，抑制率具有显著性

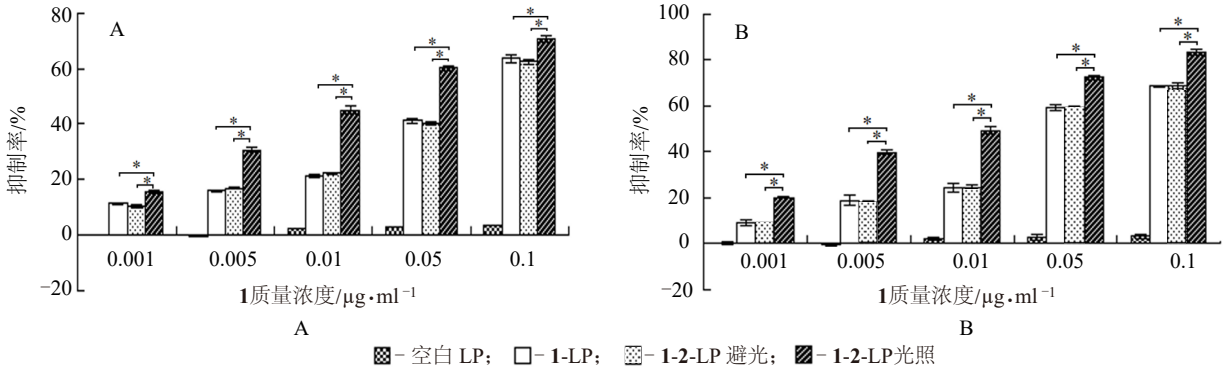


图 4　不同样品及处理方式对 HeLa 细胞（A）**和 B16-F10 细胞**（B）**的增殖抑制作用**（* 表示 *P*<0.05；*n*=3）

Fig.4　Inhibitory Effects of Different Samples and Treatments on Proliferations of HeLa Cells（A）and B16-F10 Cells（B）（* Represents *P*<0.05; *n*=3）

差异（P<0.05）；光照条件下，**1-2**-LP 对 HeLa 和 B16-F10 细胞的 IC_{50} 值分别为 0.019 和 0.010 μg/ml。上述结果说明联用光敏剂 **2** 可增加 **1** 对肿瘤细胞增殖的抑制作用，表明该给药系统中由 **2** 介导的光动力学杀伤作用与 **1** 对 HeLa 和 B16-F10 细胞的化学杀伤作用出现了明显的协同增强效果。

同时考察了 **1-2**-LP 给药 12 h 后再光照不同时间（0、1、3、5 和 10 min）对 **1-2**-LP 抑制 2 种肿瘤细胞增殖的影响，结果见图 5。可见，与避光组比，**1-2**-LP（含 **1** 0.1 μg/ml）给药 12 h 后经 532 nm 激光光照 3 min 对 HeLa 细胞的抑制率为（85.77±1.81）%，光照 5 min 对 B16-F10 细胞的抑制率为（76.24±2.10）%。对于 Hela 细胞选择光照 3 min 效果较好。对于 B16-F10 细胞，光照 5 min 的细胞抑制率较大，且与避光组有具有显著性差异。

接下来考察了 **1-2**-LP 给药后不同时间（6、12 和 24 h）给予光照（532 nm 激光照射 3 min）对 2 种肿瘤细胞的细胞毒性。研究表明，对于 HeLa 和 B16-F10 细胞，给药后 6 和 24 h 进行光照与 **1**-LP 组相比普遍有较好的抑制作用（见图 6）。

2.5.2 光敏性 **1-2**-LP 的细胞作用机制

2.5.2.1 细胞内 ROS 的检测

细胞内 ROS 的表达水平是 PDT 的一个重要指标[13—14]。取 6 孔板，放入处理过的盖玻片，使

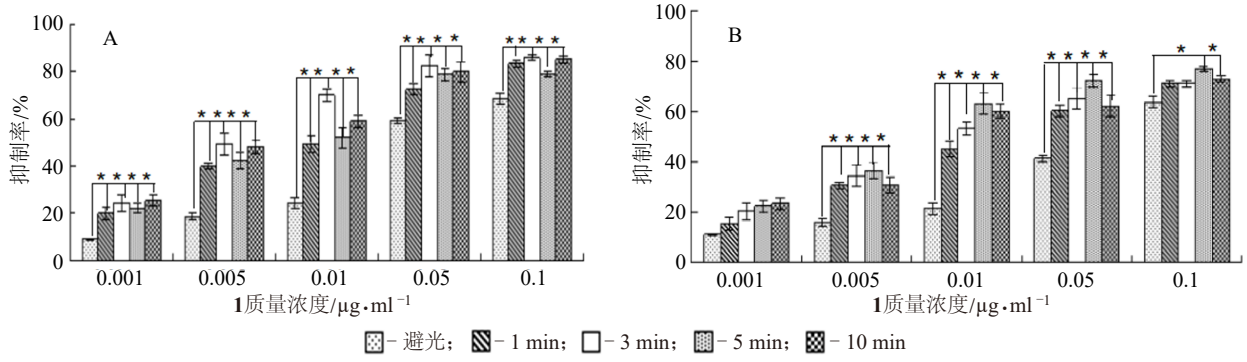


图 5 1-2-LP 给药 12 h 后光照时间对 HeLa 细胞（A）和 B16-F10 细胞（B）的增殖抑制作用

（* 表示与避光组相比，P<0.05；n=3）

Fig.5 Inhibitory Effect of Irradiation at 12 h after **1-2**-LP Administration on Proliferations of HeLa Cells (A) and B16-F10 Cells (B) (* Represents P<0.05, Compared with Dark Group; n=3)

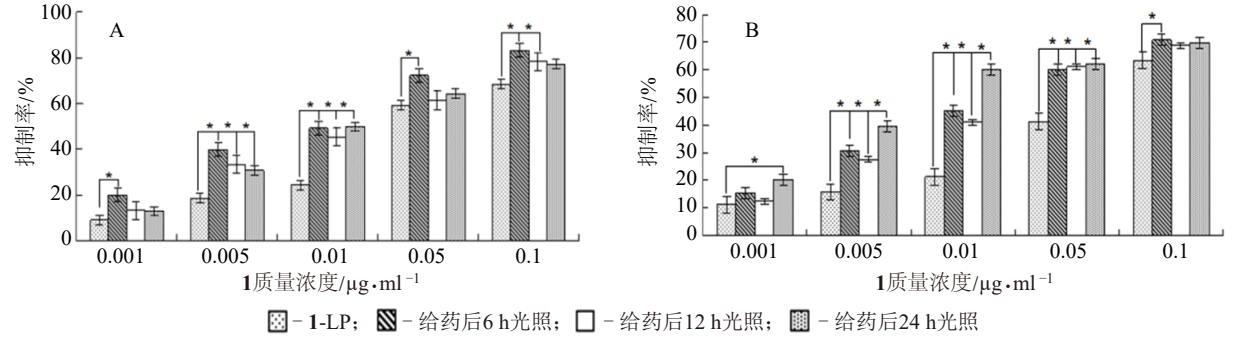


图 6 给药后不同时间进行光照对 HeLa 细胞（A）和 B16-F10 细胞（B）的增殖抑制作用

（* 表示与 **1**-LP 组相比，P<0.05；n=3）

Fig.6 Inhibitory Effect of Irradiation at Different Time Points after Administration on Proliferations of HeLa Cells (A) and B16-F10 Cells (B) (* Represents P<0.05, Compared with **1**-LP Group; n=3)

盖玻片紧贴细胞板。将对数生长期的 HeLa 和 B16-F10 细胞分别以每孔 1×10^6 个的密度接种于 6 孔板中。设置 **2** PBS 溶液（10 μg/ml）的避光组、光照组、含同等浓度 **2** 的 **1-2**-LP 光照组（光照、避光条件同“**2.5.1**”项）。在培养箱中培养 48 h 后，弃去培养基后，每孔加入稀释好的 10 μmol/L ROS 荧光探针 2,7- 二氯二氢荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）。使用 532 nm 激光每孔照射 5 min，继续培养 30 min，取出后用细胞培养基洗涤 3 次，去除胞外残留的 DCFH-DA，取出细胞玻片置载玻片上，在荧光显微镜下观察细胞内的荧光情况。结果见图 7。

结果显示，避光组在显微镜下无荧光显像，而加入 **2** 的不同制剂和分子探针 DCFH-DA 共同处理并光照后的细胞内绿色荧光强度明显增强。这表明经 **2** 的不同制剂处理后，HeLa 和 B16-F10 细胞在光照过程中有 ROS 产生，继而将无荧光的 2,7- 二氯二氢荧光素（DCFH）氧化生成有荧光的 2,7- 二氯荧光素（DCF），引起细胞内荧光增强。

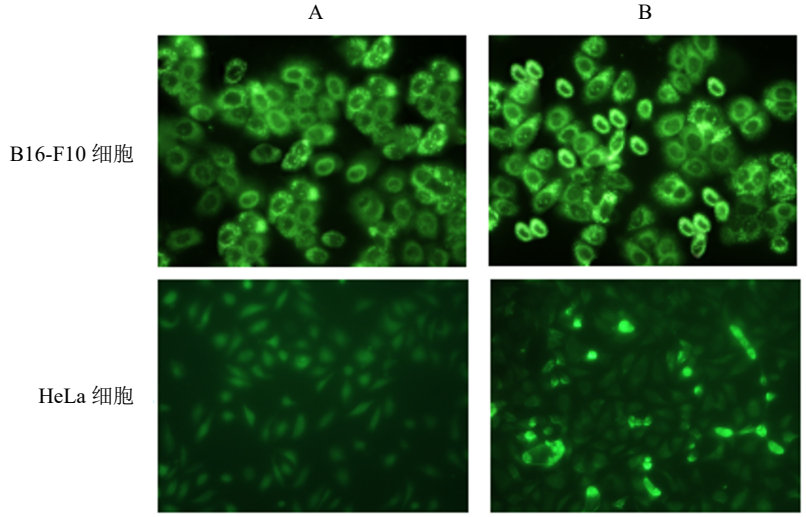
2.5.2.2　1-2-LP 对细胞周期的影响

将对数生长期的 HeLa 和 B16-F10 细胞分别以每孔 5×10^5 个的密度接种于 6 孔培养板中。设置 **1**-LP 组和 **1-2**-LP（含 **1** 0.01 μg/ml）光照组（给药后 12 h 用 532 nm 激光照射 5 min）。置培养箱中继续培养 48 h，消化收集细胞，加入预冷至 4 ℃的 PBS，轻轻吹打至细胞重悬，离心（18 080×*g*）5 min，向收集的细胞沉淀中加入预冷至 4 ℃的 70% 冰乙醇 2 ml，固定约 24 h，离心弃去固定液，沉淀用 PBS 洗涤 2 次后重悬，加入碘化丙啶（PI）染液，37 ℃避光温浴 30 min，用流式细胞仪分析。

PI 可与细胞内的 DNA 结合，通过流式细胞仪检测 PI 的荧光强度可直接反映细胞内的 DNA 含量[15]。通过 PI 染色后经流式细胞仪检测分析，将 G0/G1 期、G2/M 期、S 期区分开来。结果如表 1 所示，对于 HeLa 和 B16-F10 细胞的空白对照组，大部分细胞处于 G0/G1 期；而 **1**-LP 组和 **1-2**-LP 光照组细胞的细胞周期发生变化，G0/G1 期有所下降，G2/M 期和 S 期所占比例增加。

2.5.2.3　1-2-LP 对细胞凋亡的影响

本研究采用双染法，使用流式细胞仪测定待测细胞混悬液的荧光强度来区分正常细胞、坏死细胞及凋亡细胞。将对数生长期的 HeLa 和 B16-F10 细胞的细胞密度调整为每孔 5×10^5 个，接种于 6 孔板中。设置空白细胞组、空白 LP 组、**2** 溶液光照组、**2** 溶液避光组、**1**-LP 组、**1-2**-LP 光照组，脂质体中



A：DCFH-DA+**2** 光照组，B：DCFH-DA+**1-2**-LP 光照组

图 7　光照条件下 HeLa 和 B16-F10 细胞内 ROS 检测的荧光显微镜图像（×20）

Fig.7　Fluorescence Microscopic Images of ROS Detection in HeLa and B16-F10 Cells under Illumination Conditions（×20）

表 1 经 1-LP 或 1-2-LP 处理 48 h 的 HeLa 和 B16-F10 细胞的细胞周期比例 [1)]/%

Tab.1 Cell Cycle Distributions of HeLa and B16-F10 Cells Treated with **1**-LP or **1-2**-LP for 48 h/%

组别	各周期比例		
	G0/G1期	G2/M期	S期
空白细胞组	66.78(54.40)	2.65(1.03)	30.57(44.57)
1-LP组	29.93(43.28)	13.46(18.10)	56.60(54.29)
1-2-LP光照组	24.97(33.92)	20.74(24.18)	54.29(41.90)

注：[1)] 括号内外分别是 B16-F10 和 HeLa 细胞的检测结果

均含 **1** 0.01 μg/ml，避光条件同“**2.5.1**”项，光照条件同“**2.5.2.2**”项。置培养箱中继续培养 48 h，将细胞收集到离心管中，离心（18 080×*g*）5 min，小心弃去上清液，沉淀中加入预冷至 4 ℃的 PBS，重复洗涤 2 次；将洗涤后的细胞沉淀重新分散至 PBS 100 μl 中，调整细胞密度为每 1 ml 含 1×10^6 个，加入 Annexin V-FITC 5 μl 和 100 μg/ml 的 PI 溶液 2 μl。室温避光孵育 15 min，然后迅速用流式细胞仪进行分析。结果如图 8 所示。对于 HeLa 和 B16-F10 细胞，空白细胞组凋亡率为 0.1%和 0.8%，说明细胞生长状态良好；而经过空白 LP、**2** 避光及光照、**1**-LP 和 **1-2**-LP 光照处理后，细胞凋亡率依次为 0.3%、8.5%、27.4%、29.0%、52.1%和 2.0%、2.9%、14.1%、30.9%、46.4%。由上述结果可见，**1-2**-LP 光照组的细胞凋亡率明显大于 **1**-LP 和 **2** 组，这表明光敏剂 **2** 与 **1** 联用可以诱导更多细胞发生凋亡。分析原因可能是，**2** 在光照条件下促使细胞产生 ROS，大大提高了化疗药 **1** 的抗肿瘤活性。

2.6 1-2-LP 的体内抗肿瘤效果

取 C57BL/6 小鼠于右侧颈背部皮下注射 B16-F10 细胞悬液（密度为每 1 ml 含 2×10^6 个细胞）0.1 ml 以制作小鼠黑色素瘤肿瘤模型，用数显游标卡尺测量肿瘤体积，待肿瘤体积达到 100～150 mm^3 时，将肿瘤体积和体质量相似的 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组，每组 8 只，具体分组如下。①对照组：生理盐水组；②**2**-LP（含 **2** 3 mg/ml）避光（用适当遮光材料遮光）组；③ **1**-LP（含 **1** 3 mg/ml）组；④ **1-2**-LP（含 **1** 3 mg/ml）光照（用 532 nm 激光间隔 24 h 照射瘤部位 3 min，照射距离为 10 cm）组。4 组小鼠均采用腹腔注射给药，每组均注射 2 ml。每隔 1 d 测量并记录荷瘤小鼠肿瘤的长径与短径，计算肿瘤体积。给药后 d14 处死小鼠，剥离瘤块，称定，根据下式计算肿瘤生长抑制率。

肿瘤生长抑制率 =（1 - 试验组平均瘤重 / 对照组平均瘤重）×100%

2.6.1 肿瘤体积

在整个试验过程中，观察到小鼠体质量没有显著性变化；各组小鼠肿瘤的生长抑制率曲线见图 9，与对照组相比，**1**-LP 组在给药 9 d 后肿瘤体积基本不再增长，**1-2**-LP 光照组则呈明显下降趋势，具有显著性差异（$P<0.05$）。**2**-LP 组与对照组相似，肿瘤体积呈现出快速增长的趋势。说明 **2** 在不光照的情况下对肿瘤并没有抑制作用，**1**-LP 组对肿瘤具有一定的抑制作用，而 **1-2**-LP 光照组通过将光敏剂 **2** 的 PDT 与 **1** 化学疗法相结合，大大增加了对肿瘤的抑制作用，使肿瘤体积减小，这就说明产生了协同增强的作用。

2.6.2 肿瘤生长抑制率

各组肿瘤生长抑制率结果见表 2。剥离后的 B16-F10 实体瘤外观形态见图 10。**1-2**-LP 光照组对 B16-F10 肿瘤的抑制率为 85.33%。经 SPSS 20.0 统计软件分析，3 个试验组结果之间均具有显著差异（$P<0.05$）。由图 10 可见，**1-2**-LP 光照组肿瘤明显减小，提示 **1-2**-LP 光照组的肿瘤抑制效果比 **1**-LP 组和 **2** 组更好。这也验证联合了 **2** 的 PDT 与 **1** 的化学疗法的脂质体具有协同增效作用。

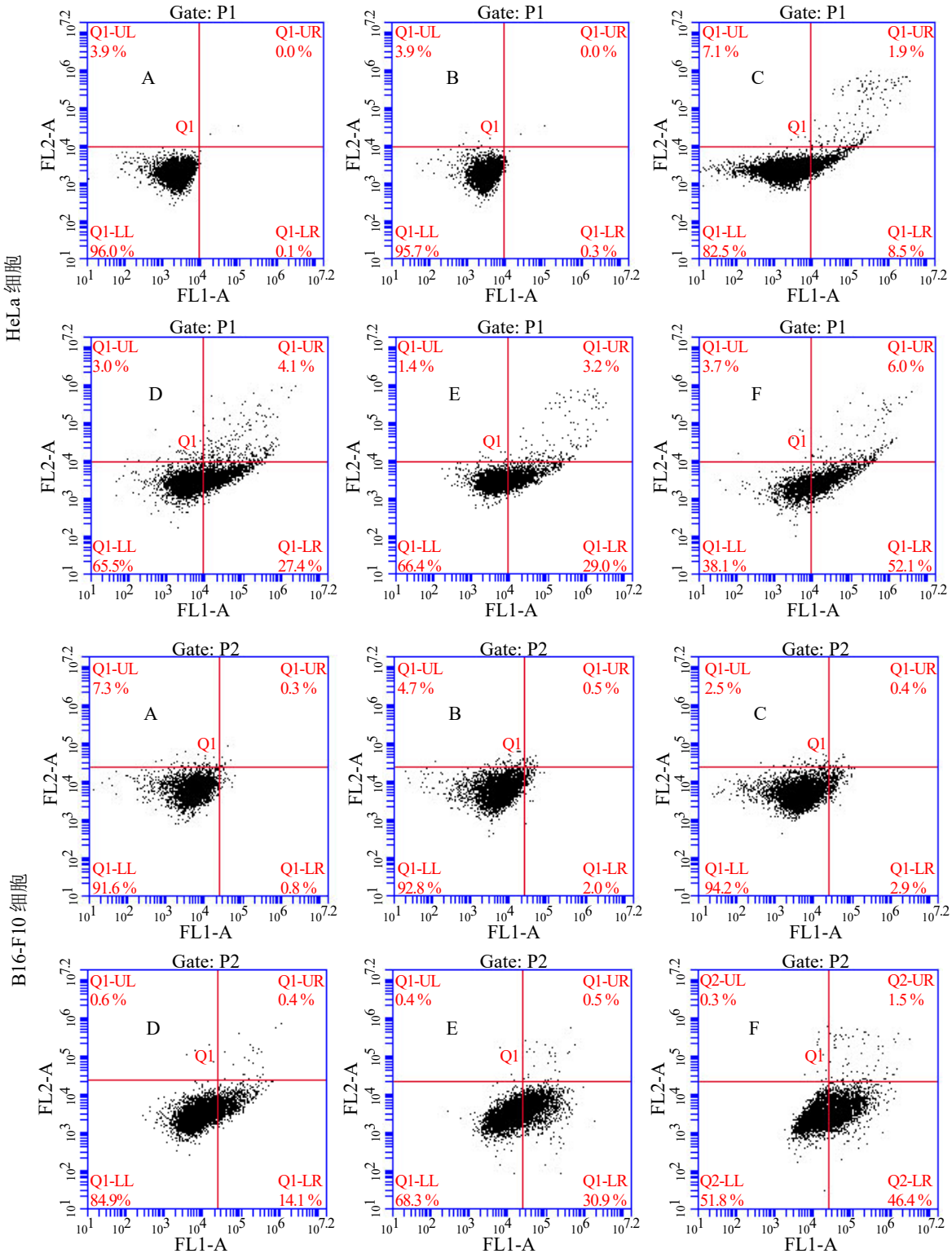
表 2 肿瘤抑制率结果（$\bar{x}\pm s$，n=8）

Tab.2 Results of Tumor Growth Inhibition Rates（$\bar{x}\pm s$, n=8）

组别	瘤重/g	抑瘤率/%
对照组	0.75±0.25	-
2-LP避光组	0.73±0.25	2.67
1-LP组	0.23±0.04	68.38
1-2-LP光照组	0.03±0.02	85.33

3 总结

近年来研究表明，**2** 经一定波长的紫外光或可见光照射，能产生对细胞有毒性的 ROS 杀死肿瘤



A：空白细胞组，B：空白 LP 组，C：**2** 避光组，D：**2** 光照组，E：**1**-LP 组，F：**1**-**2**-LP 光照组

图 8　Annexin V-FITC/PI 双染后 HeLa 和 B16-F10 细胞的细胞凋亡图

Fig.8　Apoptosis Diagrams of HeLa and B16-F10 Cells Double Stained by Annexin V-FITC and PI

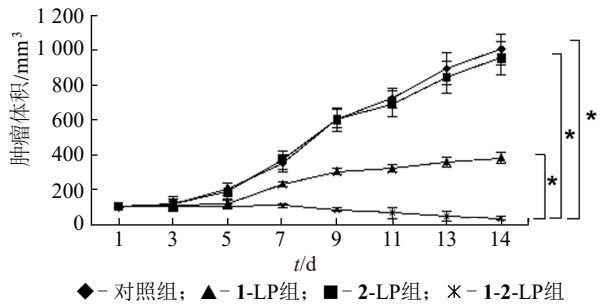


图 9 B16-F10 肿瘤的生长曲线

（* 表示与对照组相比，P<0.05；n=8）

Fig.9 Growth Curves of B16-F10 Tumor (* Represents P<0.05, Compared with the Control Group; n=8)

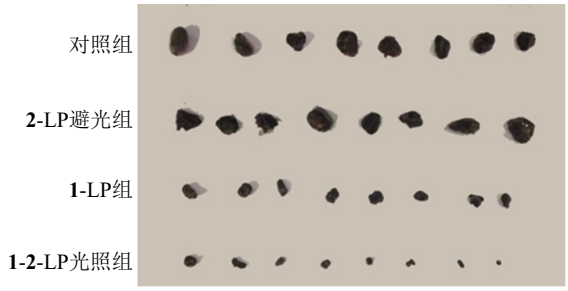


图 10 B16-F10 肿瘤的外观形态

Fig.10 Morphological Features of B16-F10 Tumors

细胞，达到抗肿瘤效果[16—17]。本研究采用薄膜分散法将光敏剂 **2** 和化疗药 **1** 包载于脂质体中，制得的 **1-2**-LP 平均粒径约 170 nm，粒径均一，包封率为 (86.38±0.99) %，体外释放结果表明该脂质体具有缓释效果。

细胞毒性试验结果表明，**1-2**-LP 光照组对 HeLa 和 B16-F10 细胞的抑制作用明显高于其避光组。细胞内 ROS 水平的检测结果证表明该系统在光照条件下能引起细胞内产生 ROS，验证了光敏剂的 PDT 效应。细胞凋亡和细胞周期检测结果表明，**1-2**-LP 经光照后可引起细胞周期发生改变，并诱导更多的细胞凋亡，凋亡机制可能与细胞内产生 ROS 有关。C57BL/6 小鼠黑色素瘤模型的药效学研究表明，与对照组比，**1-2**-LP 光照组小鼠肿瘤体积呈明显下降趋势，瘤重明显减小，对黑色素瘤的抑制率为 85.33%，与 **1**-LP 组具有显著差异。本试验表明，**1-2**-LP 比单一疗法具有更好的抗肿瘤效果，有利于避免单一治疗方法引起的肿瘤细胞耐药，提高抗肿瘤效率。

参考文献：

[1] IKEDA A, MAE T, UEDA M, *et al*. Improved photodynamic activities of liposome-incorporated [60] fullerene derivatives bearing a polar group [J]. *Chem Commun* (Camb), 2017, **53**(20): 2966-2969.

[2] 王 莹, 靳宁宁, 张 静. 富勒烯衍生物在光动力疗法中的研究进展[J]. 应用化工, 2019, **48**(6): 1413-1416.

[3] LI Z, PAN L L, ZHANG F L, *et al*. Preparation and characterization of fullerene (C60) amino acid nanoparticles for liver cancer cell treatment [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014, **14**(6): 4513-4518.

[4] MOURI A, YAMAGUCHI O, MIYAUCHI S, *et al*. Combination therapy with carboplatin and paclitaxel for small cell lung cancer [J]. *Respir Investig*, 2019, **57**(1): 34-39.

[5] 李 莉, 陈 迹, 王庆庆, 等. 两种化疗方案辅助治疗乳腺浸润性导管癌的成本-效果分析[J]. 中国医院药学杂志, 2019, **39**(22): 2324-2328.

[6] BHATIA R, SHARMA A, NARANG R K, *et al*. Recent nanocarrier approaches for targeted drug delivery in cancer therapy [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2021, **3**(14): 350-366.

[7] 张 颖, 许霞青, 丁孝良, 等. 光敏性多西他赛脂质体的制备、处方优化和体外释放度研究[J]. 中国医院药学杂志, 2021, **41**(24): 9-13.

[8] SHI J J, WANG Z Z, WANG L, *et al*. Photodynamic therapy of a 2-methoxyestradiol tumor-targeting drug delivery system mediated by Asn-Gly-Arg in breast cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, **8**: 1551-1562.

[9] 孙 静, 董文向, 吴 蕾, 等. 多西他赛混合胶束的制备及其性能评价[J]. 沈阳药科大学学报, 2017, **34**(9): 744-750.

[10] 冯 枫, 孙林林, 王 聚, 等. 呋喃二烯纳米脂质载体中主药含量及包封率的测定[J]. 医药导报, 2016, **35**(S1): 103-105.

[11] LI Q, HUANG C, LIU L, *et al*. Enhancing type I photochemistry in photodynamic therapy under near infrared light by using antennae-fullerene complexes [J]. *Cytometry A*, 2018, **93**(10): 997-1003.

[12] 柴冰阳, 陈泽慧, 张闪闪, 等. 4种细胞毒活性方法评价紫草素体外肿瘤细胞抑制作用效果[J]. 中草药, 2019,

50(1): 172-177.

[13] SANCHEZ-BARCELO E J, MEDIAVILLA M D. Recent patents on light based therapies: photodynamic therapy, photothermal therapy and photoimmunotherapy [J]. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 2014, **8**(1): 1-8.

[14] BALLATORE M B, DURANTINI J, GSPONER N S, *et al*. Photodynamic inactivation of bacteria using novel electrogenerated porphyrin-fullerene C60 polymeric films [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, **49**(12): 7456-7463.

[15] ANATOLE P C, GURU S K, BATHELEMY N, *et al*. Ethyl acetate fraction of *Garcina epunctata* induces apoptosis in human promyelocytic cells (HL-60) through the ROS generation and G0/G1 cell cycle arrest: a bioassay-guided approach [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, **36**(3): 865-874.

[16] GREBINYK A, GREBINYK S, PRYLUTSKA S, *et al*. C60 Fullerene accumulation in human leukemic cells and perspectives of LED-mediated photodynamic therapy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, **124**: 319-327.

[17] HAMBLIN M R. Fullerenes as photosensitizers in photodynamic therapy: pros and cons [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2018, **17**(11): 1515-1533.

(上接第334页)

[14] KOZIKOWSKI A P, SHEN S, PARDO M, *et al*. Brain penetrable histone deacetylase 6 inhibitor SW-100 ameliorates memory and learning impairments in a mouse model of fragile X syndrome [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, **10**(3): 1679-1695.

[15] GUO Z, ZHANG Z, ZHANG Y, *et al*. Design, synthesis and biological evaluation of brain penetrant benzazepine-based histone deacetylase 6 inhibitors for alleviating stroke-induced brain infarction [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, **218**: 113383.