DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.02.027

近红外光响应性榄香烯纳米乳温敏水凝胶抗 4T1 小鼠乳腺癌研究

赵梦洁,赵云龙,王华华,直炜炜,贾永艳,关延彬,韩德恩,祝侠丽
(河南中医药大学药学院,河南 郑州 450046)

摘要:目的 以 4T1 乳腺癌细胞为模型,结合 808 nm 近红外光照射,探讨共载吲哚菁绿与榄香烯纳米乳温敏水凝胶(ICG-ELE-NE-gel)的体内外抗肿瘤活性。方法 通过体外溶血试验评价 ICG-ELE-NE-gel 的生物安全性。采用 MTT 法测定 ICG-ELE-NE-gel 对 4T1 细胞体外增殖的影响;采用倒置荧光显微镜法观察 4T1 细胞的摄取效果;通过细胞划痕试验探讨细胞迁移能力的变化。建立 BALB/c 小鼠荷 4T1 乳腺癌原位移植瘤动物模型,进行红外热成像试验和体内药效学研究,ELISA 实验测定荷瘤小鼠血浆中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-6(IL-6)和干扰素 γ(IFN-γ)的水平,通过苏木精-伊红(H&E)和原位末端转移酶标记法(TUNEL)染色观察小鼠肿瘤组织病理变化。结果 ICG-ELE-NE-gel 的生物安全性较高、光热稳定性良好。ICG-ELE-NE-gel 对 4T1 细胞的抑制作用具有浓度和时间依赖性特征,能被 4T1 细胞成功摄取,且能明显抑制 4T1 细胞的水平迁移能力。ICG-ELE-NE-gel 及其激光组能够明显控制小鼠体质量及肿瘤体积的增长;可有效抑制 TNF-α 和 IL-6 的表达,促进 IFN-γ 的表达;H&E 和 TUNEL 病理组织切片显示 ICG-ELE-NE-gel 组出现明显的肿瘤细胞凋亡,当结合 808 nm 激光照射后,小鼠的肿瘤组织出现更大面积的细胞损伤或凋亡。结论 ICG-ELE-NE-gel 结合近红外光照射后对 4T1 小鼠乳腺癌的体内外抗肿瘤活性均有所增强,可同时实现肿瘤的光-热-化联合治疗。

关键词:近红外光响应;榄香烯;吲哚菁绿;纳米乳温敏水凝胶;乳腺癌;药效学
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)02-0117-12

Anti-4T1 Breast Cancer Effect of Near-Infrared Light Responsive Elemene Nanoemulsion Thermosensitive Hydrogel

ZHAO Mengjie, ZHAO Yunlong, WANG Huahua, ZHI Weiwei, JIA Yongyan, GUAN Yanbin, HAN De'en, ZHU Xiali
(Pharmacy College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China)

Abstract: *Objective* To evaluate the *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of near-infrared light responsive elemene nanoemulsion thermosensitive hydrogel (ICG-ELE-NE-gel) on 4T1 breast cancer cells when combined with 808 nm near infrared irradiation. *Methods* The biological safety of ICG-ELE-NE-gel was evaluated by hemolysis test *in vitro*. The effect of ICG-ELE-NE-gel on the proliferation of 4T1 cells *in vitro* was determined by MTT assay. The uptake effect of 4T1 cells was qualitatively observed by using an inverted fluorescence microscopy. And the changes of cell migration ability were investigated by cell scratch test. Infrared thermal imaging test and *in vivo* pharmacodynamic study were performed after the orthotopic transplantation animal model of 4T1 breast cancer in BALB/c mice was established. At the end of the pharmacodynamic experiment, the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and interferon-γ (IFN-γ) in plasma of 4T1 tumor-bearing BALB/c mice were measured by ELISA. The pathological changes of the tumor tissues were observed by H&E and TUNEL staining. *Results* ICG-ELE-NE-gel had high biological safety and good photothermal stability. ICG-ELE-NE-gel could inhibit the migration of 4T1 cells in a concentration- and time-dependent manner. ICG-ELE-NE-gel could be successfully taken up by 4T1 cells and significantly inhibited the horizontal migration of 4T1 cells. ICG-ELE-NE-gel and its laser group could significantly inhibit the growth of body weight and tumor volume of 4T1 tumor-bearing mice. The hydrogel could also effectively inhibit the expressions of TNF-α and IL-6, and promote the expression of IFN-γ. The H&E and TUNEL pathological sections showed that the tumor tissues in ICG-ELE-NE-gel group had obvious tumor cell apoptosis. When combined with 808 nm laser irradiation, there was more extensive cell damage or apoptosis. *Conclusion* ICG-ELE-NE-gel combined with near-infrared light irradiation could enhance the anti-tumor activity of 4T1 breast tumor *in vitro* and *in vivo*, and possibly realize the photothermal-chemical combination therapy of breast cancer.

Keywords: near-infrared light response; elemene; indocyanine green; nanoemulsion thermosensitive hydrogel; breast cancer; pharmacodynamics

基金项目:国家自然科学基金项目(81803740);河南省高等学校重点科研项目(23A360007)
作者简介:赵梦洁(2000-),女,河南商丘人,硕士在读,研究方向:中药学-药物新剂型与新技术。
通讯作者:祝侠丽(1980-),女,河南永城人,教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药学-药物新剂型与新技术。E-mail:zhuxiali1980@126.com。

榄香烯是我国首次从天然中药植物温莪术中提取分离的具有抗癌活性的倍半萜烯类化合物,其主要有效成分为 β-榄香烯(β-elemene, ELE)[1]。临床药理研究表明,ELE 疗效确切、不良反应轻微、抗瘤谱广[2-4],可单独或者联合其他药物用于乳腺癌、肺癌、肝癌等的临床治疗。ELE 能够通过多途径、多分子、多靶点及多个信号通路,使肿瘤细胞凋亡、细胞周期受到

阻滞、获能过程受到抑制、集落形成能力减弱、增强对化疗药物的敏感性、逆转耐药作用等,从而对多种恶性肿瘤细胞产生明显的抑制和杀灭作用[5]。ELE 能激活机体抗肿瘤免疫功能,抑制肿瘤细胞的淋巴系统转移,也可联合放疗、化疗产生增效减毒作用[6-8]。

近红外光(near-infrared,NIR,700~1000 nm)对生物组织具有较强的穿透深度和时空可控性,可有效避免对正常组织的损伤[9],在肿瘤治疗中具有很大的潜力[10-12]。肿瘤光热治疗(photothermal therapy,PTT)通过近红外光照射将光热材料转化为热能,实现肿瘤局部靶向治疗效果[13-14]。吲哚菁绿(indocyanine green,ICG)是被批准上市可用于临床的光热材料[15],具有较高的光热转换率和近红外荧光成像能力[16],生物安全性好,可用于肿瘤成像诊断和光热治疗[17]。但 ICG 体内半衰期仅有 2~4 min,且极易与血浆白蛋白结合从体内消除[18]。

纳米乳温敏水凝胶兼具纳米乳与温敏水凝胶的双重优势[19-21],可通过肿瘤组织局部注射给药,延长药物在肿瘤组织的滞留时间,提高药物的稳定性和生物利用度。课题组前期通过水相滴定法制备共载 ICG 与 ELE 的纳米乳,以壳聚糖(chitosan,CS)和 β-甘油磷酸钠(sodium β-glycerophosphate,β-GP)为主要材料制备温敏水凝胶,然后将两者按照一定比例混合制备共载吲哚菁绿与榄香烯纳米乳温敏水凝胶(ICG-ELE-NE-gel,设计思路见插页 XX 图 1)。本实验以 ICG-ELE-NE-gel 为研究对象,以 4T1 乳腺癌细胞和 4T1 乳腺癌原位移植瘤小鼠为模型,结合 808 nm 近红外光照射,探讨 ICG-ELE-NE-gel 体内外抗肿瘤活性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Fluke Ti-400 红外热成像仪(福禄克电子仪器仪表公司);SW-CJ-2FD 型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);L530 型低温台式离心机(湖南湘仪实验室开发有限公司);MW-GX-808/3000 mW 激光仪(长春镭仕光电科技有限公司);CCL-240B-8 型二氧化碳培养箱(新加坡 ESCO 公司);1510 型全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);Primo Vert 倒置显微镜(德国 Carl Zeiss 公司);XDS-1B 型倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯株式会社);Merk 手持式细胞计数仪(美国 Millipore Sigma 公司);0~150 mm 电子数显卡尺(上海申韩量具有限公司)。

1.2 药品与试剂

β-榄香烯原料药(ELE,纯度≥95.0%,批号 201001,苏州纳美特生物科技有限公司);吲哚菁绿(ICG,批号 D30GS172943,上海源叶生物科技有限公司);榄香烯注射液[石药集团远大(大连)制药有限公司];RPMI Medium 1640(北京索莱宝科技有限公司);二苯基四氮唑溴盐(MTT,北京博奥拓达科技有限公司);磷酸盐缓冲盐(PBS,北京索莱宝科技有限公司);4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,上海碧云天生物技术有限公司);无噬菌体胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司);胰蛋白酶(北京雷根生物技术有限公司);小鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-6(IL-6)和干扰素 γ(IFN-γ)ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司);苏木精-伊红(H&E)染液和 TUNEL 试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.3 细胞与动物

小鼠乳腺癌 4T1 细胞(河南中医药大学武香香教授课题组赠予);SPF 级 BALB/c 小鼠[♀,16 g,7 周龄,实验单位许可证号 SYXK(豫)2020-0004;实验动物许可证号 SCXK(鲁)20190003,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司]。本实验经过河南中医药大学动物实验伦理审查委员会审查批准(DWLL201830029)。

2 方法与结果

2.1 ICG-ELE-NE-gel 的制备与表征

首先采用水相滴定法制备 ICG-ELE-NE,处方组成:蓖麻油聚氧乙烯醚(EL-35)0.24 g,聚乙二醇-400(PEG-400)0.16 g,油酸乙酯(EO)0.12 g,榄香烯(ELE)0.06 g,0.3 mg·mL^{-1}的吲哚菁绿水溶液 3.0 mL。测得 ICG-ELE-NE 粒径为(85.61±0.35)nm,电位为(-21.4±0.6)mV,包封率为(98.51±0.39)%,载药量为(10.96±0.24)%。表明 ICG-ELE-NE 具有较好的均匀性,粒径大小符合 2020 年版《中华人民共和国药典》相关规定。

采用冷溶法制备 ICG-ELE-NE-gel,取 2.5% 的壳聚糖溶液 3 mL 置于磁力搅拌器上搅拌,搅拌过程中滴加 ICG-ELE-NE 1 mL,持续搅拌 15 min 后,滴加 800 mg·mL^{-1}的 β-甘油磷酸钠溶液 1 mL,再继续搅拌 5 min 即得 ICG-ELE-NE-gel。结果显示 ICG-ELE-NE-gel 的胶凝温度和胶凝时间分别 37 ℃和 150 s,微观呈疏松多孔的网络结构。

2.2 ICG-ELE-NE 的溶血性考察

2020 年版《中华人民共和国药典》第四部中规定注射剂应当进行溶血性考察[22]。取 36 支试管分为 12 组,每组 3 支,按表 1 依序加入 2% 红细胞悬液、生理盐水和不同量的 ICG-ELE-NE(1~5 为样品组,6 为阴性对照组,7 为阳性对照组,8~12 为样品对照组,详见表 1),将各试管轻度摇动混匀后(插页 XX 图 2A),在 37 ℃温育,观察 1~7 管内溶血情况(插页 XX 图 2B)。3 h 后在 1500 r·min^{-1}转速下离心 5 min(插页 XX 图 2C),以纯化水为空白,在 545 nm 波长处测定吸光度 A 值,并按下列公式计算溶血率[23]:溶血率 = ($A_{样品}$ - $A_{阳性对照}$ - $A_{阴性对照}$)/($A_{阳性对照}$ - $A_{阴性对照}$)×100%。由插页 XX 图 2D 可见,加入不同体积 ICG-ELE-NE 的红细胞悬液红细胞全部下沉,分层界面明显,各浓度下溶血率均低于 3%。表明 ICG-ELE-NE 生物安全性良好。

表 1 ICG-ELE-NE 溶血试验分组情况(n=3)

分组	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2%红细胞悬液/(mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	/	/	/	/	/
生理盐水/(mL)	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	/	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9
纯化水/(mL)	/	/	/	/	/	/	2.5	/	/	/	/	/
ICG-ELE-NE/(mL)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	/	/	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1

2.3 ICG-ELE-NE-gel 体外抗肿瘤活性研究

2.3.1 样品溶液的配制 精密称取 10 mg ELE,溶于 0.5 mL DMSO 中,用 4.5 mL 1640 培养基(含 10% 胎牛血清、100 μg·mL^{-1}链霉素、100 U·mL^{-1}青霉素)稀释配制为浓度为 300、200、150、100 μg·mL^{-1};将 ELE 注射液、ICG-ELE-NE 和 ICG-ELE-NE-gel 用 1640 培养基稀释配制浓度为 100、150、200、300 μg·mL^{-1}。将空白纳米乳(ICG-NE)和空白凝胶(ICG-NE-gel)按照上述样品方法进行同步稀释。

2.3.2 MTT 细胞实验 将复苏的 4T1 细胞接种 1640 培养基中,在 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度条件下培养,隔天传代[24-25]。取对数生长期的 4T1 细胞,以 2×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板,同时设置空白对照组,空白对照组加 200 μL 不含细胞的完全培养液,用 PBS 填充孔板四周,然后将 96 孔板置于培养箱继续培养。待细胞贴壁后,加入 200 μL 不同浓度梯度的样品继续培养。在终止培养 4 h 前,取出 96 孔板,每孔加入 5 mg·mL^{-1}的 MTT 溶液 20 μL,放入培养箱中避光孵育 4 h 后

再次取出,弃培养液,每孔加 150 μL DMSO,于平板摇床上以 1500 r·min^{-1}振荡 15 min,用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度(OD)值,每组设 6 个复孔。

2.3.3 空白载体对 MCF-7 细胞的影响 按“2.3.2”项下进行细胞培养。待细胞贴壁后,加入 200 μL 不同浓度的空白纳米乳(ICG-NE)和空白凝胶(ICG-NE-gel),继续培养 24、48 h。以下操作同“2.3.2”项测定 OD 值,按下列公式计算细胞存活率:细胞存活率 = ($OD_{样}$ - $OD_{空}$)/($OD_{阴}$ - $OD_{空}$) × 100%。如插页XXI图 3 所示,4T1 细胞正常培养 24、48 h 后,空白纳米乳(插页XXI图 3A)和空白凝胶(插页XXI图 3B)在与加药组相同浓度范围内,细胞存活率均高于 90%,表明空白载体毒性较弱,基本不会抑制 4T1 细胞的增殖。

2.3.4 不同制剂对 MCF-7 细胞的影响 按“2.3.2”项下进行细胞培养。待细胞贴壁后,加入 200 μL 不同浓度的 ELE 溶液、ICG-ELE-NE 和 ICG-ELE-NE-gel,继续培养 24、48、72 h。以下操作同“2.3.2”项测定 OD 值,按照下列公式计算细胞抑制率:细胞抑制率 = ($OD_{阴}$ - $OD_{样}$)/($OD_{阴}$ - $OD_{空}$) × 100%。

插页XXI图 4A ~ C 显示,ELE 溶液、ELE 注射液、ICG-ELE-NE 和 ICG-ELE-NE-gel 孵育 24、48、72 h 对 4T1 细胞增殖均有抑制作用,且随着给药浓度和孵育时间的增加而增强。孵育时间相同的情况下,相同浓度的 ELE 溶液和注射液对 4T1 细胞的抑制效果相差不大。随着孵育时间的延长,ICG-ELE-NE-gel 组的细胞抑制率与其他制剂组之间的差异显著增大。

ICG-ELE-NE 和 ICG-ELE-NE-gel 激光组在给药后用 808 nm 激光(2.5 W·cm^{-2})照射 3 min,然后继续孵育 24 h,考察 ICG-ELE-NE 和 ICG-ELE-NE-gel 结合激光照射对 4T1 细胞增殖的影响,结果见插页XXI图 4D。由插页XXI图 4D 可知,结合 808 nm(2.5 W·cm^{-2})激光照射可显著增强 ICG-ELE-NE 和 ICG-ELE-NE-gel 对 4T1 细胞的增殖抑制作用。如当给药浓度为 150 μg·mL^{-1}时,ICG-ELE-NE 加激光组的细胞抑制率由(45.46 ± 7.28)% 升至(51.32 ± 2.31)%,ICG-ELE-NE-gel 加激光组的细胞抑制率由(43.24 ± 3.12)% 升至(57.32 ± 3.56)%。

2.3.5 细胞摄取试验 取对数生长期的 4T1 细胞,以 2×10^5 个/孔的细胞密度接种于 12 孔板制作细胞爬片[26],置于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养,待细胞融合至 70% ~ 80% 时,弃去孔中原有培养液,每孔用 1 mL PBS 冲洗 3 次,加入 ELE 浓度为 200 μg·mL^{-1}的 ICG 溶液、ICG-ELE-NE 或 ICG-ELE-NE-gel,每组设 3 个复孔。分别在孵育 0.5、1、2、4 h 取出 12 孔板,弃去原有培养液,每孔用 1 mL PBS 冲洗 3 次,加入 4 % 的组织细胞固定液 600 μL 固定 15 min,用无菌 PBS 溶液冲洗 3 遍。避光条件下每孔加入 DAPI 染色液 300 μL,避光染色 15 min 后,弃去染色液,用无菌 PBS 溶液冲洗 3 遍。将细胞爬片取出,用抗荧光淬灭封片液封片后于暗盒中保存。调整荧光信号通道,于倒置荧光显微镜下观察并采集图像。采用 Image J 软件将同一视野绿光通道下拍摄的 ICG 摄取情况和蓝光通道下拍摄的 DAPI 摄取情况结果进行 Merge,并将绿光通道下拍摄的摄取量进行荧光强度分析。

由插页XXII图 5A 可见,ICG 溶液、ICG-ELE-NE 以及 ICG-ELE-NE-gel 均能被 4T1 细胞所摄取。随着孵育时间的延长,ICG 溶液组 4T1 细胞的摄取量减少,ICG-ELE-NE 和ICG-ELE-NE-gel 组的摄取量则逐渐增加。由插页XXII图 5B 可见,在 2 ~ 4 h 时,各组荧光密度由强到弱的顺序:ICG-ELE-NE-gel 组 > ICG-ELE-NE 组 > ICG 溶液组,表明 ICG-ELE-NE-gel 可被细胞大量摄取,具有较好的缓释性和持久性。

2.3.6 细胞迁移试验 将对数生长期的 4T1 细胞,以 5×10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板中,置 37 ℃、5% CO_2 条件下培养至细胞单层覆盖孔板底部。用 200 μL 无菌塑料吸管尖垂直刮在细胞层上形成痕迹,使横线横穿各孔,每孔划 3 条线,用无菌 PBS 溶液清洗 3 遍以清洗脱离细胞,在显微镜下观察并记录细胞初始划痕状态。加入 200 μg·mL^{-1}的 ELE 溶液、ICG-ELE-NE 或 ICG-ELE-NE-gel 后置培养箱中孵育 36 h 取出,其中 ICG-ELE-NE 和 ICG-ELE-NE-gel 激光组在孵育 2 h 后取出用 808 nm 激光(2.5 W·cm^{-2})照射 3 min,然后再放入培养箱继续孵育。弃去含药培养液,用无菌 PBS 溶液清洗 3 遍,用显微镜观察并记录 36 h 细胞划痕状态的图像,分析不同时间图像中划痕区域的变化情况,每组试验重复 3 次。采用 Image J 软件计算 0 h 和 t h 的划痕面积($S_{初}$ 和 S_t),按下列公式计算划痕迁移率:迁移率 = ($S_{初}$ - S_t)/$S_{初}$ × 100%。

由插页XXIII图 6 可见,ELE 溶液、ICG-ELE-NE 和 ICG-ELE-NE-gel 对 4T1 细胞的迁移能力均有明显的抑制作用。ELE 溶液组、ICG-ELE-NE 组和 ICG-ELE-NE-gel 组 4T1 细胞的迁移率分别为(45.92 ± 2.20)%,(4.91 ± 2.30)% 和(4.04 ± 1.60)%,表明 ICG-ELE-NE 和 ICG-ELE-NE-gel 均能明显抑制 4T1 细胞的水平迁移能力。另外,ICG-ELE-NE 和 ICG-ELE-NE-gel 结合 808nm 激光照射后的迁移率分别降低至(-5.86 ± 2.30)% 和(-7.86 ± 2.30)%,表明结合 808 nm 激光照射抑制 4T1 细胞迁移的作用增强。

2.4 ICG-ELE-NE-gel 的体内抗肿瘤活性研究

2.4.1 4T1 乳腺癌原位移植瘤模型的建立 取对数生长期的 4T1 细胞,计数后用生理盐水稀释至浓度为 2×10^6 个·mL^{-1}的细胞悬液。于经皮下接种于雌性 BALB/c 小鼠右侧第 4 乳头的脂肪垫处,每只 0.1 mL,共接种 70 只。小鼠正常喂食并密切观察肿瘤的生长状况,采用游标卡尺测量肿瘤的长径(a)和短径(b),按照公式 $V = a \times b^2/2$,计算肿瘤体积。待肿瘤体积增长至 100 ~ 200 mm^3 认为造模成功。

2.4.2 红外热成像试验 取荷 4T1 雌性 BALB/c 小鼠 3 只,将小鼠固定后,分别尾静脉注射生理盐水 0.1 mL、ICG-ELE-NE 0.1 mL,经肿瘤组织注射 ICG-ELE-NE-gel 0.1 mL。各组给药 0、2 h 后,采用近红外 808 nm 激光(2.5 W·cm^{-2})照射小鼠肿瘤部位,分别在照射 0、1、2、3 min 时采用红外热成像仪对荷瘤小鼠进行拍照,记录照射不同时间肿瘤部位的温度变化情况。

由插页XXIII图 7 所示,随着照射时间的延长,各组小鼠肿瘤部位的温度均逐步上升。ICG-ELE-NE 组和生理盐水组小鼠肿瘤部位的温度变化不大,这可能因为尾静脉注射给药后,ICG-ELE-NE 中的 ICG 还未到达肿瘤部位;经瘤内注射的 ICG-ELE-NE-gel 组小鼠肿瘤部位的温度则明显上升,当激光照射时间为 2、3 min 时,小鼠肿瘤组织的温度分别升至 38.9 ℃和 44.9 ℃。给药 2 h 后,生理盐水组小鼠肿瘤部位的温度仍无明显变化;ICG-ELE-NE 组小鼠肿瘤部位的温度上升,当激光照射时间为 2、3 min 时,小鼠肿瘤组织的温度分别上升至 37.5 ℃和 43.3 ℃,表明其中的部分 ICG 已到达肿瘤组织;ICG-ELE-NE-gel 组小鼠肿瘤部位的温度仍呈明显上升趋势,进一步说明 ICG-ELE-NE-gel 光热稳定性良好。基于上述结果,在下一步的体内药效学实验中,经小鼠尾静脉注射给药组在给药 2 h 后进行照射,瘤内注射给药组在给药立即

进行照射,照射时间均为 3 min。

2.4.3 ICG - ELE - NE - gel 的药效学试验 取荷 4T1 细胞的雌性 BALB/c 小鼠 54 只,随机分为 9 组,每组 6 只。具体分组如下:①NS 组;②NS + Laser 组;③ELE 溶液组;④ICG - NE - gel 组;⑤ICG - NE - gel + Laser 组;⑥ICG - ELE - NE 组;⑦ICG - ELE - NE + Laser 组;⑧ICG - ELE - NE - gel 组;⑨ICG - ELE - NE - gel + Laser 组。给药前禁食 12 h,自由饮水。①②③⑥⑦组尾静脉注射给药,其他组通过肿瘤内注射给药。每 3 天给药 1 次,共给药 4 次,给药剂量为 30 mg · kg^{-1}[27-28]。⑤⑨组给药后立即用 808 nm 激光(2.5 W · cm^{-2})照射小鼠肿瘤部位 3 min,②⑤组则在给药 2 h 后进行激光照射。实验中保证小鼠正常饮食、饮水,并密切观察小鼠的生活状态。每次给药前测定小鼠体质量和肿瘤大小,并绘制小鼠体质量和相对肿瘤体积随时间变化曲线。实验结束后,将各组小鼠通过眼球取血,在 4500 r · min^{-1}转速下离心 15 min,取上层血清在 -80 ℃冰箱保存备用。解剖取各组小鼠的肿瘤组织,将瘤块置于通用型组织细胞固定液,并于 4 ℃保存备用。

如插页 XXⅣ图 8A 所示,各组小鼠初始体质量均在 20 g 左右,实验结束时各组小鼠体质量变化不大。如插页 XXⅣ图 8B 所示,各组小鼠相对肿瘤体积均呈不断增长趋势,但增长速度不同。在 0 ~ 4 d 内,各组小鼠的相对肿瘤体积变化幅度较小;在 6 ~ 12 d,各组小鼠的相对肿瘤体积增长幅度开始增加。不同治疗组之间比较,生理盐水组、生理盐水加激光组和 ICG - NE - gel 空白载体组小鼠相对肿瘤体积增长迅速,ICG - NE - gel 加激光组小鼠的相对肿瘤体积小于生理盐水组。ELE 溶液组小鼠肿瘤体积变化较小,表明 ELE 溶液可在一定程度上抑制肿瘤的生长增殖。ICG - ELE - NE 组和 ICG - ELE - NE - gel 组小鼠相对肿瘤体积的增长较为缓慢,表明两种制剂对小鼠肿瘤均具有较显著的抑制作用。ICG - ELE - NE 和 ICG - ELE - NE - gel 结合激光照射后,小鼠相对肿瘤体积的增长速度减慢,这可能因为吲哚菁绿光热治疗和榄香烯药物治疗的双重作用。

2.4.4 病理组织切片分析 药效学实验结束后,将荷瘤小鼠处死并解剖取其肿瘤组织,用生理盐水清洗干净后浸泡于通用型组织细胞固定液中保存,采用石蜡包埋技术制备肿瘤切片。通过苏木精 - 伊红(H&E)染色法和原位末端转移酶标记法(TUNEL)进行染色,采用显微镜观察各组肿瘤组织的形态学变化并进行分析。

插页 XXⅤ图 9 为各组小鼠肿瘤组织 H&E 染色病理切片图,其中蓝紫色代表苏木精染色的细胞核,粉红色代表伊红染色的细胞质或细胞外基质。由插页 XXⅤ图 9 可知,生理盐水组肿瘤细胞排列紧密,细胞核呈现蓝紫色,表明该组肿瘤细胞仍处于增殖期,生长旺盛;ICG - NE - gel 组肿瘤细胞排列紧密,少部分细胞出现核损伤,结合 808 nm(2.5 W · cm^{-2})激光照射后出现多数肿瘤细胞核萎缩、细胞质破裂溶解现象,表明肿瘤细胞在光热作用下出现热消融,发生凋亡;与生理盐水组相比,ELE 溶液组肿瘤组织大量细胞发生核溶解消失或萎缩变形的情况。ICG - ELE - NE 组和 ICG - ELE - NE - gel 组均大面积出现肿瘤细胞核溶解消亡、细胞质破损现象;结合激光照射后肿瘤组织发生细胞凋亡的面积增大,细胞核数量减少。ICG - ELE - NE - gel 组细胞核数量最少,这很可能因为 ICG - ELE - NE - gel 经瘤内注射给药后,可以使药物缓慢释放并在肿瘤部位蓄积;结合 808 nm 激光照射可加速药物的释放和跨膜转运,发挥药物化疗与光热治疗的双重作用,对肿瘤细胞的杀伤作用更强,因而ICG - ELE - NE - gel 加激光组核溶解消失或萎缩现象发生最为严重。

插页 XXⅥ图 10 为各组小鼠肿瘤组织 TUNEL 病理切片图,其中蓝色荧光为 DAPI 染色的活细胞的细胞核,绿色荧光为 FITC 荧光素标记的阳性凋亡细胞核。由插页 XXⅥ图 10 可知,各组小鼠肿瘤组织 TUNEL 病理切片结果分析与 H&E 病理切片结果一致。生理盐水组和 ICG - NE - gel 组肿瘤组织受损较少,ELE 溶液组出现部分肿瘤细胞凋亡现象,ICG - ELE - NE 组和 ICG - ELE - NE - gel 组则出现大量肿瘤细胞凋亡。当结合 808 nm 激光照射后,各组小鼠的肿瘤组织受损程度均较无激光照射时严重,出现更大面积细胞损伤或凋亡,绿色荧光面积增大。

2.4.5 小鼠血清中 TNF - α、IL - 6 及 IFN - γ 含量的测定 药效学试验结束后,采用 ELISA 检测法测定各组小鼠血清中 TNF - α、IL - 6 及 IFN - γ 含量。具体操作如下:先将 - 80 ℃保存的各组小鼠的血清取出,在室温放置平衡 60 min 至融化;将 4 ℃冷藏保存的 TNF - α、IFN - γ 及 IL - 6 试剂盒取出,在室温放置平衡 15 ~ 30 min 后方可使用;分别设空白孔、待测样品孔和标准品孔。往待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL,再加待测样品 10 μL,轻轻晃动酶标板至样液混匀;空白孔中加样品稀释液 50 μL;标准品孔中加各种不同浓度的标准品 50 μL。除空白孔外,每孔加入酶标试剂 100 μL;用封板膜封板后置 37 ℃恒温箱中温育 60 min;小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干。每孔加洗涤液 300 μL,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 遍,拍干;每孔先加入显色剂 A 50 μL,避光条件下再加入显色剂 B 50 μL,轻轻震荡至 A、B 混匀,于 37 ℃下避光显色 15 min;每孔加入终止液 50 μL,可观察到溶液由蓝色迅速转为黄色,终止反应;在加终止液后 15 min 内,以空白孔为对照,依序测量各孔在 450 nm 波长的吸光度。

表 2 各组 4T1 荷瘤小鼠血清中 TNF - α、IL - 6 及 IFN - γ 的含量($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg · kg^{-1})	TNF - α/(pg · mL^{-1})	IL - 6/(pg · mL^{-1})	IFN - γ/(pg · mL^{-1})
空白	-	25.39 ± 2.31	102.96 ± 1.01	33.23 ± 2.74
①NS	-	76.48 ± 1.92	146.01 ± 2.43	17.41 ± 2.03
②NS + Laser	-	67.29 ± 3.47	134.76 ± 4.78	17.14 ± 2.33
③ELE 溶液	30	61.59 ± 2.73	110.04 ± 1.14	26.21 ± 3.94
④ICG - NE - gel	30	63.24 ± 4.35	107.71 ± 3.52	15.68 ± 2.36
⑤ICG - NE - gel + Laser	30	69.84 ± 4.52	130.63 ± 7.83	17.48 ± 2.36
⑥ICG - ELE - NE	30	64.33 ± 4.38	125.17 ± 3.91	18.57 ± 2.94
⑦ICG - ELE - NE + Laser	30	56.29 ± 3.81	96.33 ± 2.45	26.89 ± 2.21
⑧ICG - ELE - NE - gel	30	58.74 ± 2.34	85.21 ± 1.14	26.28 ± 1.97
⑨ICG - ELE - NE - gel + Laser	30	30.48 ± 3.06	82.58 ± 3.69	30.03 ± 0.55

由表 2、插页 XXⅦ图 11 可知,各组小鼠血清中的 TNF - α、IL - 6、IFN - γ 的含量水平均具有一定的差异。各给药组小鼠血清中 TNF - α、IL - 6 含量均低于生理盐水组;ICG - ELE - NE - gel 组 TNF - α、IL - 6 含量低于 ELE 溶液组;ICG - ELE - NE 和 ICG - ELE - NE - gel 加激光组的 TNF - α、IL - 6 含量均低于不加激光组。除 ICG - NE - gel 组外,各实验组的 IFN - γ 含量均高于生理盐水组;ICG - ELE - NE 和 ICG - ELE - NE - gel 加激光组 IFN - γ 的含量均高于 ELE 溶液组和不加激光组。

3 讨论

本课题选择小鼠乳腺癌细胞 4T1 为肿瘤细胞模型,并结合 808 nm(2.5 W · cm^{-2})激光照射探讨 ICG - ELE - NE - gel 对肿瘤细胞体外增殖的影响;采用倒置荧光显微镜定性观察 4T1

细胞对 ICG 所制不同制剂孵育不同时间的摄取效果;进行细胞划痕试验探讨 ICG - ELE - NE - gel 对 4T1 细胞迁移能力的影响。实验结果显示不同制剂对 4T1 细胞的抑制率均显现出浓度依赖和时间依赖的特点,结合 808 nm 激光照射下,ICG - ELE - NE - gel 对 4T1 细胞的抑制作用增强;ICG - ELE - NE - gel 能够被 4T1 细胞摄取,并能明显抑制 4T1 细胞的水平迁移能力。

建立 BALB/c 小鼠荷 4T1 乳腺癌原位移植瘤动物模型,并结合 808 nm(2.5 W · cm^{-2})激光进行红外热成像试验和体内药效学研究。实验结果表明 ICG - ELE - NE - gel 的光热稳定性良好;ICG - ELE - NE - gel 及激光组能够明显控制小鼠体质量及肿瘤体积的增长。病理组织切片结果可观察到 ICG - ELE - NE 组和 ICG - ELE - NE - gel 组明显的肿瘤细胞凋亡,且当结合 808 nm 激光照射后,小鼠的肿瘤组织受损程度均较无激光照射时严重,进一步证明 ICG - ELE - NE - gel 结合近红外激光照射后可对荷瘤小鼠产生更强的抗肿瘤作用。

TNF - α、IL - 6 及 IFN - γ 是较为常见的细胞炎性因子,是多种肿瘤病情进展和预后的生物标志物。TNF - α 是反映全身或局部炎症的重要细胞因子,是炎症反应过程中出现最早、最重要的炎性介质。IL - 6 是淋巴细胞等在免疫调节、炎症反应等过程中生成的一种重要多效性细胞因子,已成为多种肿瘤病情进展和预后的生物标志物。IFN - γ 具有对抗炎性细胞因子的作用,主要的生物学功能是抗肿瘤、抗病毒和免疫调节。药效学试验给药结束后,采用 ELISA 检测法测定各组小鼠血清中 TNF - α、IL - 6 及 IFN - γ 含量,分析不同治疗方法治疗后荷 4T1 乳腺癌原位移植瘤 BALB/c 小鼠的预后情况[29 - 30]。结果显示,ICG - ELE - NE - gel 可有效抑制 TNF - α 和 IL - 6 的表达,促进 IFN - γ 的表达。

参考文献

[1] ZHAI B T, ZENG Y Y, ZENG Z W, et al. Drug delivery systems for elemene, its main active ingredient β - elemene, and its derivatives in cancer therapy[J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 6279 - 6296.
[2] CHEN P, LI X J, ZHANG R N, et al. Combinative treatment of β - elemene and cetuximab is sensitive to KRAS mutant colorectal cancer cells by inducing ferroptosis and inhibiting epithelial - mesenchymal transformation[J]. Theranostics, 2020, 10(11): 5107 - 5119.
[3] HAN B, WANG T, XUE Z G, et al. Elemene nanoemulsion inhibits metastasis of breast cancer by ROS scavenging[J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 6035 - 6048.
[4] BAI Z Q, YAO C S, ZHU J L, et al. Anti - tumor drug discovery based on natural product β - elemene: anti - tumor mechanisms and structural modification[J]. Molecules, 2021, 26(6): 1499.
[5] 杨军,王丽均,缪娴,等. β - 榄香烯作用于 JAK2/STAT3 通路抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭行为[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2023,57(6): 594 - 598.
[6] 王路芳. β - 榄香烯通过介导 β - catenin/TCF7/Sox2 信号通路抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭及上皮间质变的转化[D]. 沈阳:中国医科大学,2018.
[7] 潘燕红. 基于有氧糖酵解探讨 β - 榄香烯抑制乳腺癌转移作用[D]. 南京:南京中医药大学,2018.
[8] 苏鹏宇. β - 榄香烯在三阴乳腺癌中对 5FU 增敏作用及分子机制研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2019.
[9] 李青坡. 近红外光介导的阿霉素光敏脂质体药物控制释放与肿瘤治疗研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
[10] ZHANG P, LI X F, XU Q N, et al. Polydopamine nanoparticles with different sizes for NIR - promoted gene delivery and synergistic photothermal therapy[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2021, 208: 112125.
[11] MOU J, LIN T Q, HUANG F Q, et al. A new green titania with enhanced NIR absorption for mitochondria - targeted cancer therapy[J]. Theranostics, 2017, 7(6): 1531 - 1542.
[12] CHEN M M, SONG F F, FENG M, et al. pH - sensitive charge - conversional and NIR responsive bubble - generating liposomal system for synergetic thermo - chemotherapy[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018, 167: 104 - 114.
[13] 饶稳. 基于光热治疗的纳米载体系统用于肿瘤联合治疗[D]. 武汉: 湖北大学, 2023.
[14] RAN Y L, HU J F, CHEN Y Y, et al. Morusin - Cu(II) - indocyanine green nanoassembly ignites mitochondrial dysfunction for chemo - photothermal tumor therapy[J]. J Colloid Interface Sci, 2024, 662: 760 - 773.
[15] AUNG W, TSUJI A B, SUGYO A, et al. Near - infrared photoimmunotherapy of pancreatic cancer using an indocyanine green - labeled anti - tissue factor antibody[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(48): 5491 - 5504.
[16] 华明丽. 负载去甲苗三硫和吲哚菁绿纳米给药体系的构建及其抗肿瘤活性研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2021.
[17] 周晓, 金观桥. 诊疗一体的吲哚菁绿纳米体系介导的光热疗法在多模态抗肿瘤治疗中的应用进展[J]. 医学综述, 2022, 28(4): 712 - 717.
[18] PORCU E P, SALIS A, GAVINI E, et al. Indocyanine green delivery systems for tumour detection and treatments[J]. Biotechnol Adv, 2016, 34(5): 768 - 789.
[19] 张晨, 杨雪, 李维达, 等. 姜黄素纳米乳温敏水凝胶的制备及其在慢性湿疹治疗中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2023, 54(6): 909 - 918, 926.
[20] CONG Z T, SHI Y B, PENG X, et al. Design and optimization of thermosensitive nanoemulsion hydrogel for sustained - release of praziquantel[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2017, 43(4): 558 - 573.
[21] WU H A, SONG L N, CHEN L, et al. Injectable thermosensitive magnetic nanoemulsion hydrogel for multimodal - imaging - guided accurate thermoablative cancer therapy[J]. Nanoscale, 2017, 9(42): 16175 - 16182.
[22] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社,2020.
[23] 陆主航, 刘祖浩, 王雪莲, 等. 载山柰酚长循环靶向脂质体的处方筛选及抗卵巢癌疗效评估[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(21): 2411 - 2418.
[24] MELLO D F, TREVISAN R, RIVERA N, et al. Caveats to the use of MTT, neutral red, Hoechst and Resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity[J]. Chem Biol Interact, 2020, 315: 108868.
[25] 冯佳, 袁傲, 黄芳, 等. 半枝莲含药血清通过抑制 mTOR 信号通路影响非小细胞肺癌 NCI - H1650 细胞上皮间质转化[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(6): 60 - 64.
[26] LI Y J, ZHU Y H, CHEN J Q, et al. Thermo - sensitive injectable hydrogel loading with elemene - loaded liposomes for enhanced anti - tumor effect[J]. J Biomater Appl, 2023, 37(10): 1847 - 1857.
[27] 张艺, 杭太俊, 宋敏. 载药脂质体包封率测定方法的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(2): 245 - 252.
[28] 王静,李学涛,袁子民. β - 榄香烯纳米聚合物胶束包封率、载药量及释药性测定[J]. 中国中医药信息杂志,2017,24(2): 91 - 93.
[29] 高丙晶. 白细胞介素 6 转录调控和信号转导机制在疾病靶向治疗中应用[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(6): 744 - 748.
[30] 吴文清, 万玲, 徐秀芬, 等. 晚期恶性肿瘤患者血清 TNF - α 和 IL - 6 水平与胰岛 β 细胞功能不全的关系分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2021, 26(12): 1127 - 1130.

近红外光响应性榄香烯纳米乳温敏水凝胶抗 4T1 小鼠乳腺癌研究

（正文见 117－121 页）

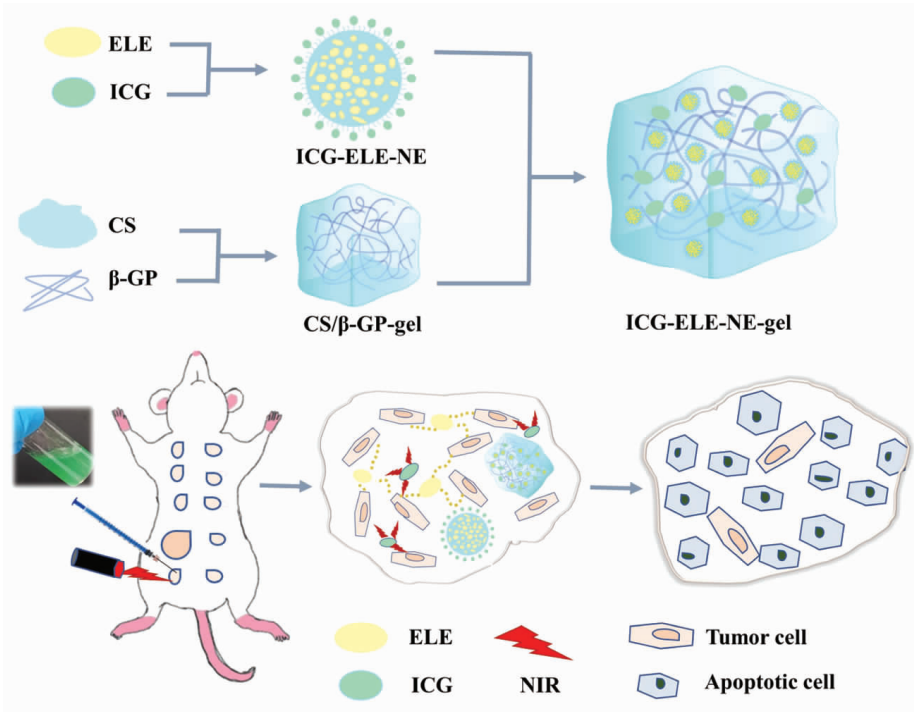
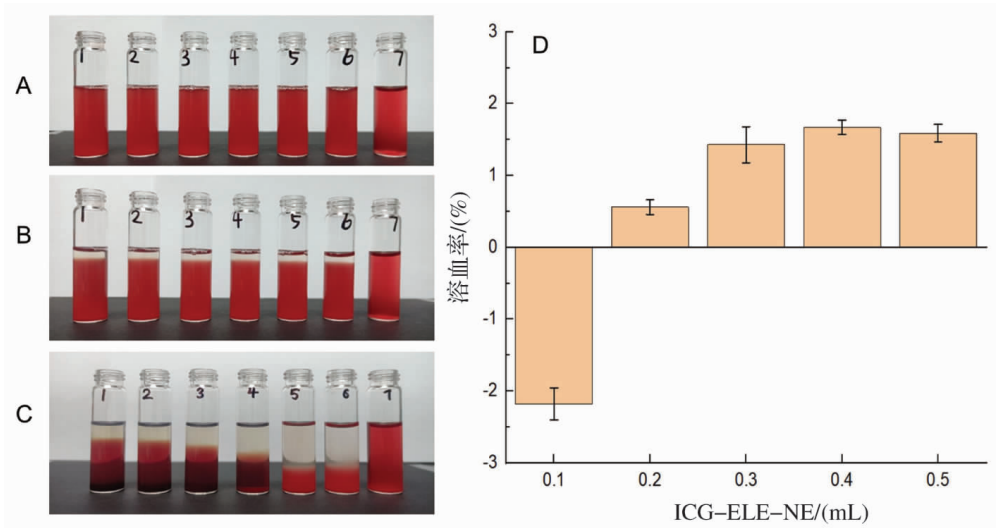


图 1　ICG－ELE－NE－gel 设计思路



注：A. 各试管轻度摇动混匀后，B. 各试管在 37 ℃温育溶血情况，C. 各试管离心 5 min 后；1～5 为样品组，6 为阴性对照组，7 为阳性对照组。

图 2　ICG－ELE－NE 的溶血性考察

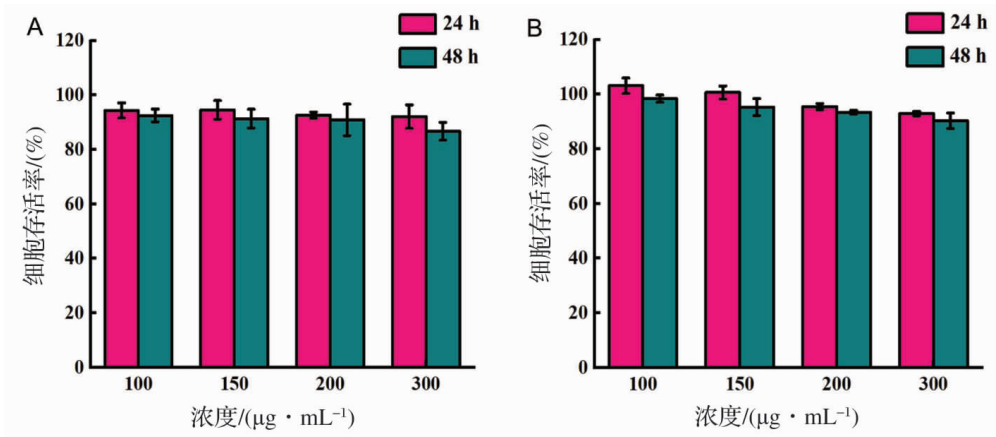
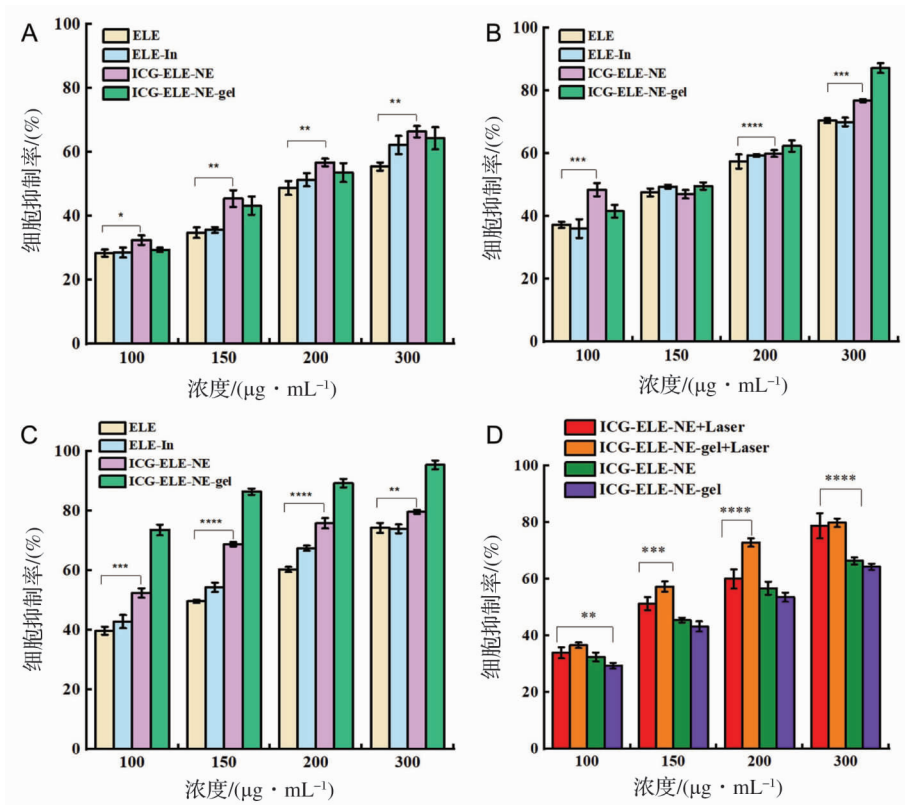
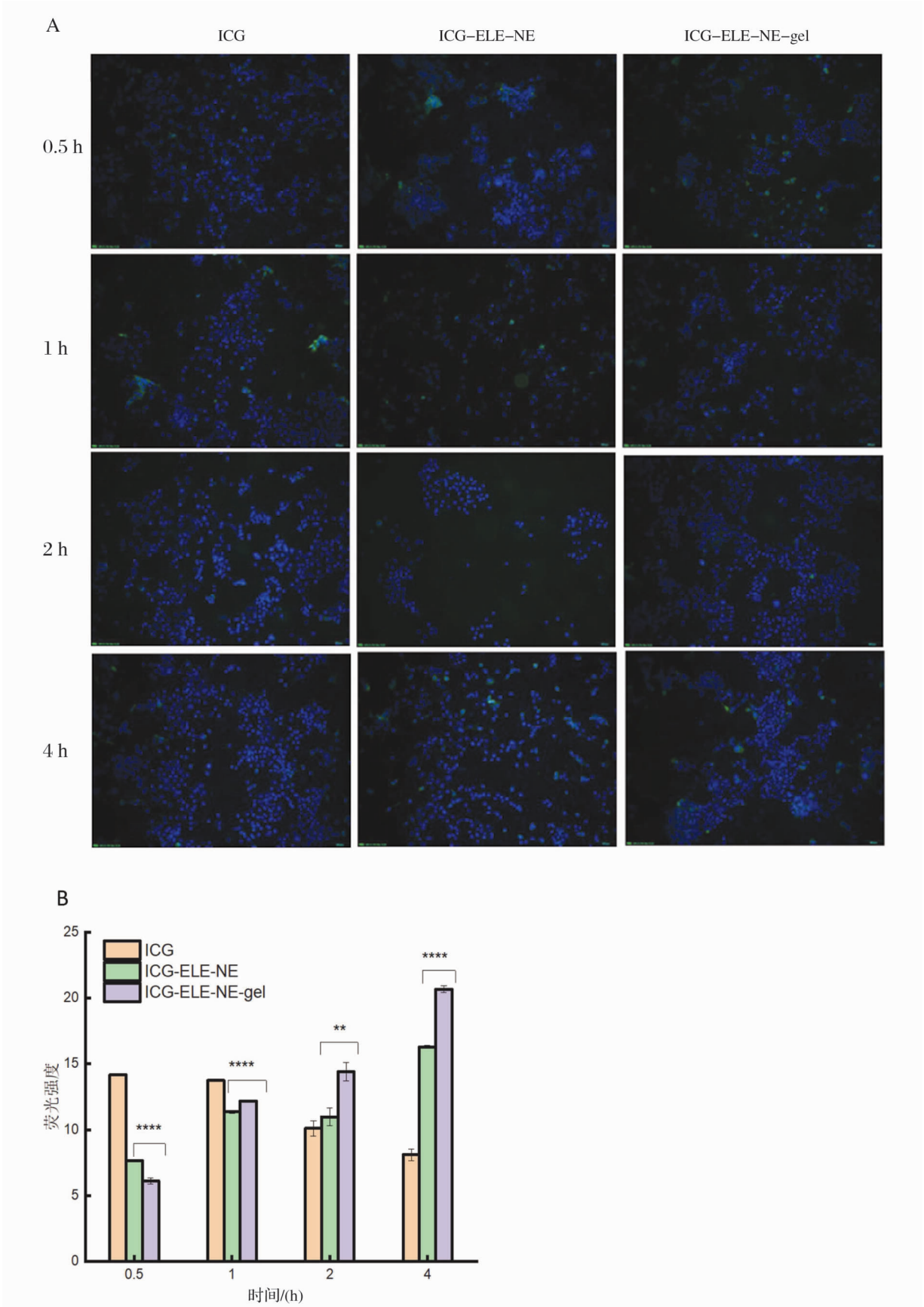


图 3　空白纳米乳(A)和空白凝胶(B)对 4T1 细胞活性的影响($n=6$)



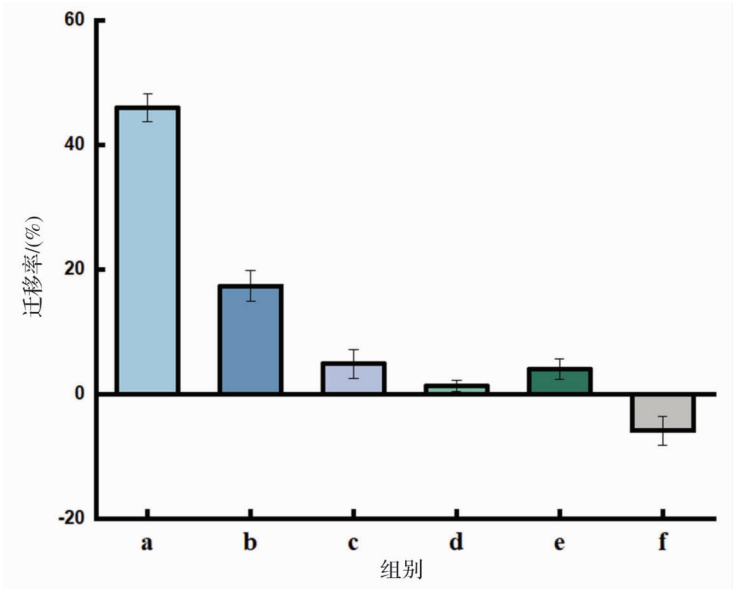
注:A ~ C. 不同制剂孵育不同时间对 4T1 细胞活性的影响;D. 近红外光照射下不同制剂对 4T1 细胞活性的影响。＊＊$P<0.05$,＊＊＊$P<0.01$,＊＊＊＊$P<0.001$。

图 4　不同制剂对 4T1 细胞活性的影响($n=6$)



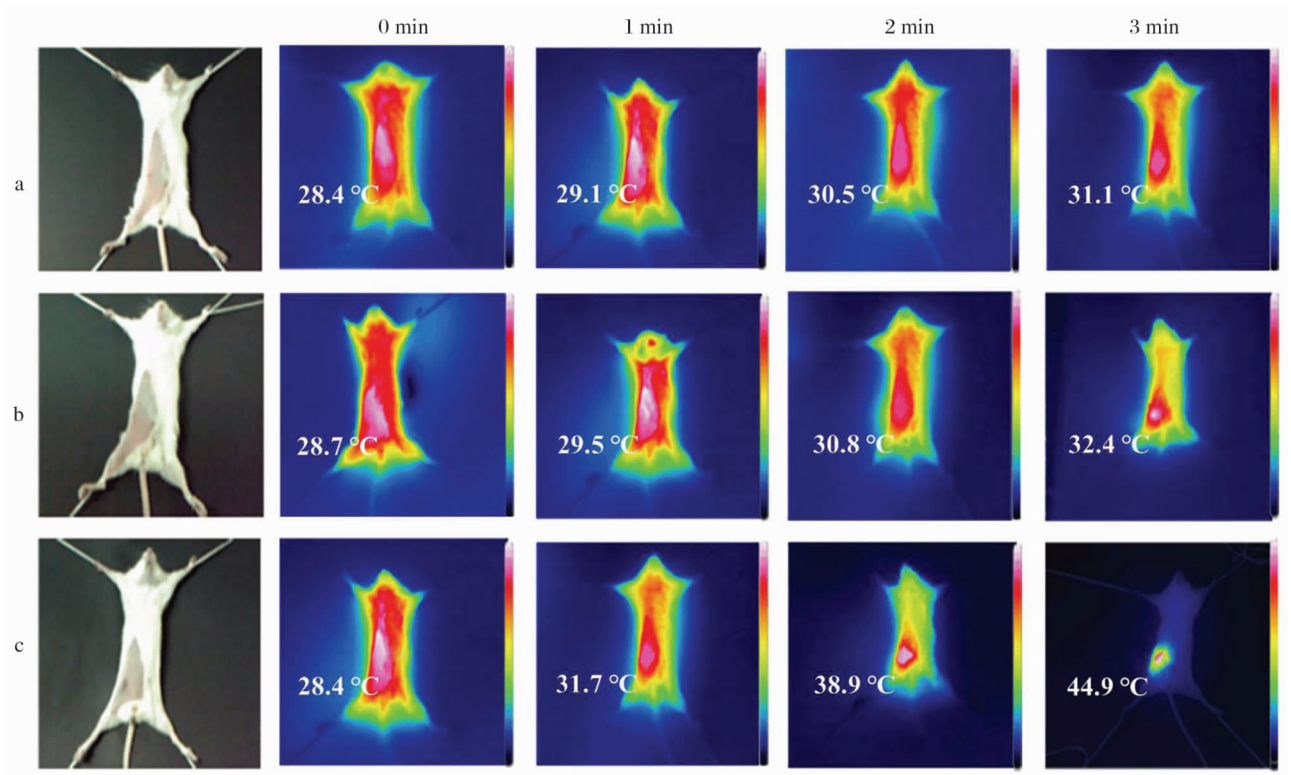
注：＊＊$P<0.05$，＊＊＊$P<0.01$，＊＊＊＊$P<0.001$。

图 5 不同制剂孵育不同时间被 4T1 细胞摄取图（A）和结果分析（B）



注：a：Control，b：ELE 溶液，c：CG－ELE－NE，d：ICG－ELE－NE＋Laser，e：ICG－ELE－NE－gel，f：ICG－ELE－NE－gel＋Laser。

图 6　不同制剂组 4T1 细胞的划痕迁移率（$n=3$）



注：a～c 依次为 NS、ICG－ELE－NE、ICG－ELE－NE－gel。

图 7　各组 4T1 荷瘤小鼠给药 0 h 后红外热成像试验结果

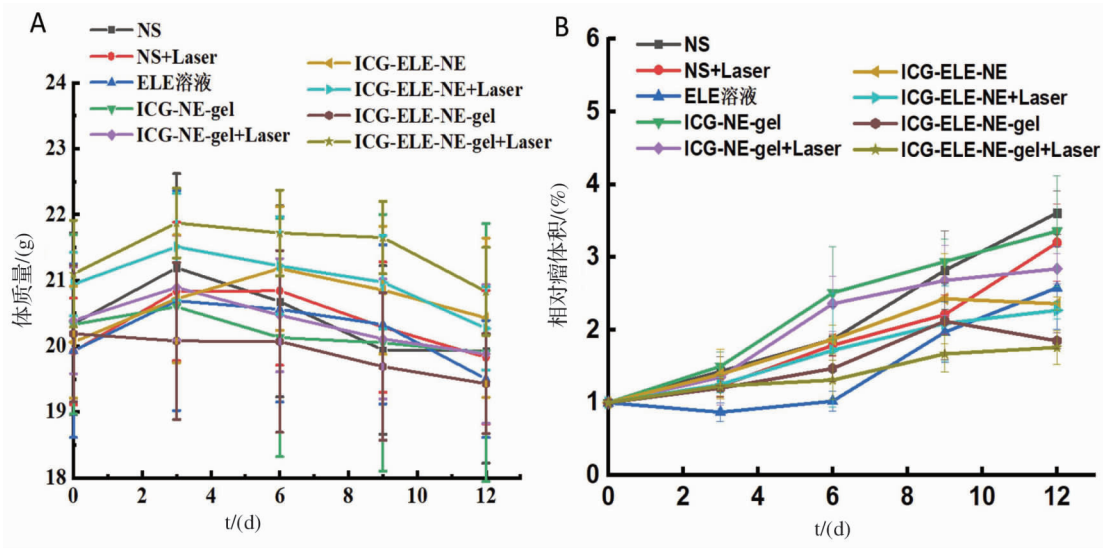


图 8　各组 4T1 荷瘤小鼠体质量(A)和相对瘤体积(B)随时间的变化曲线(n = 6)

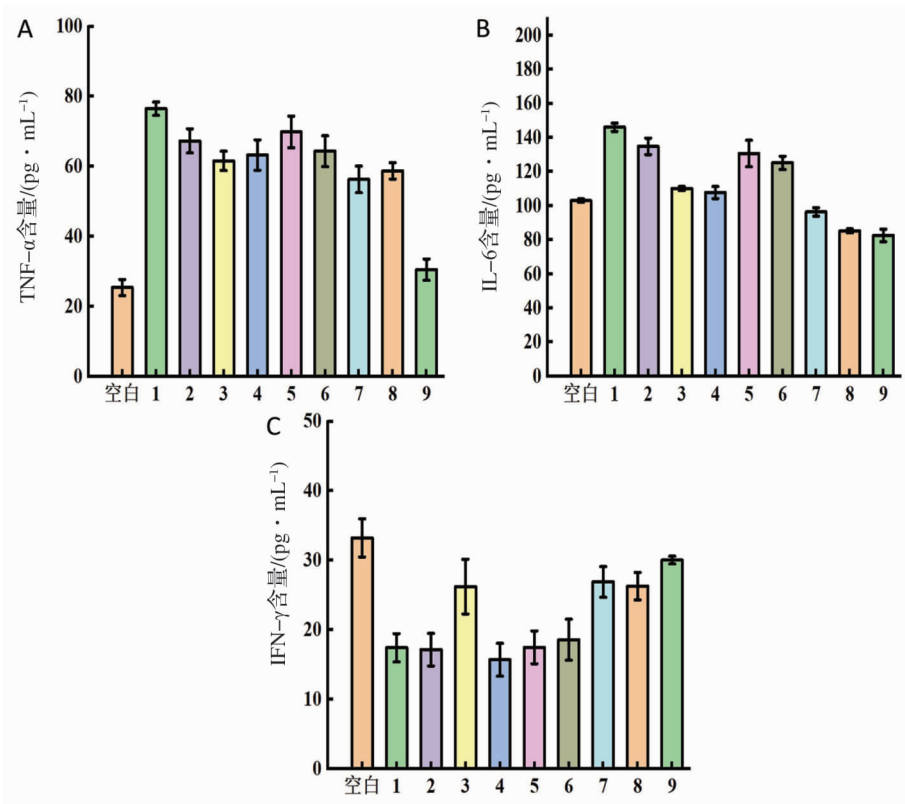
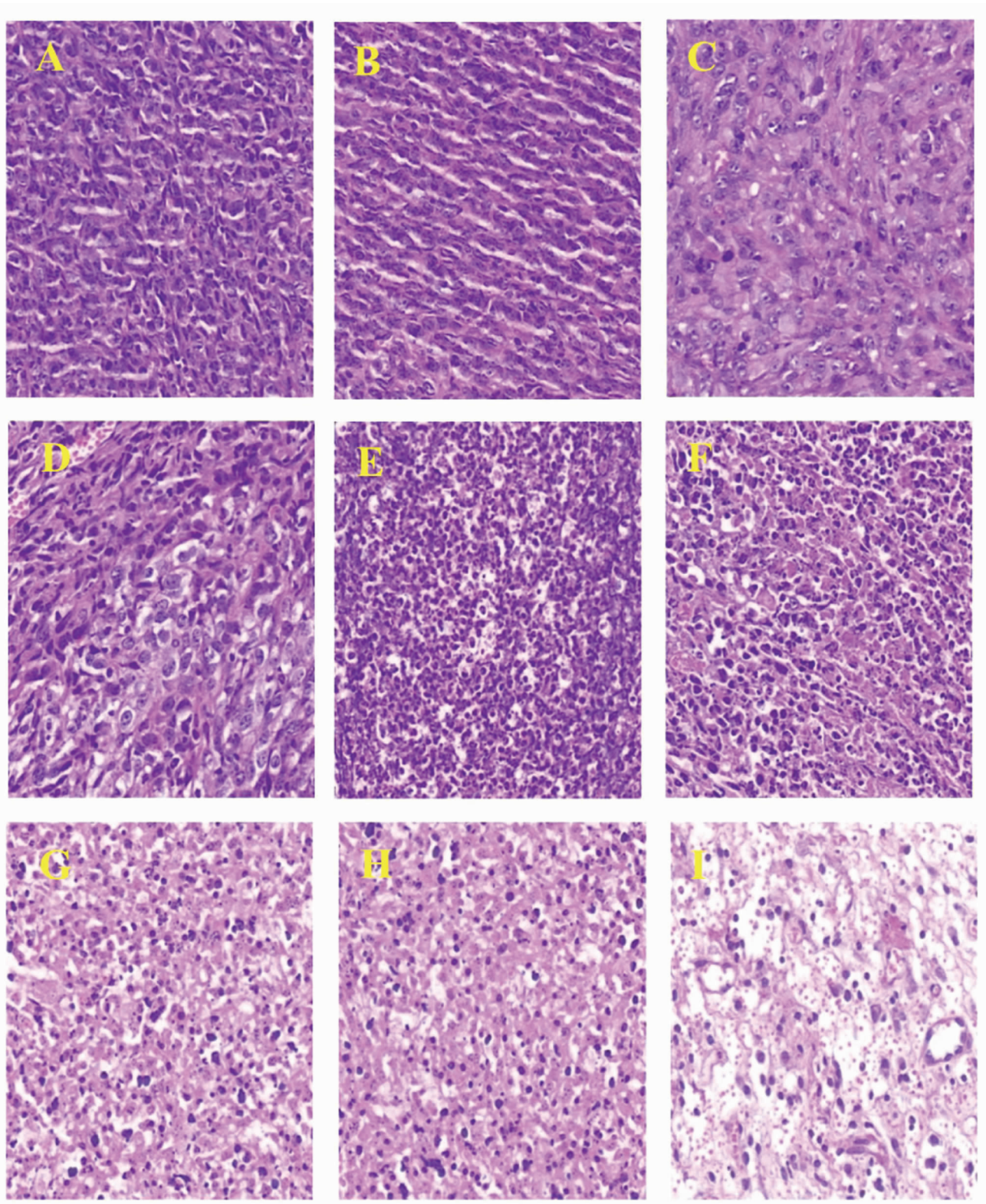
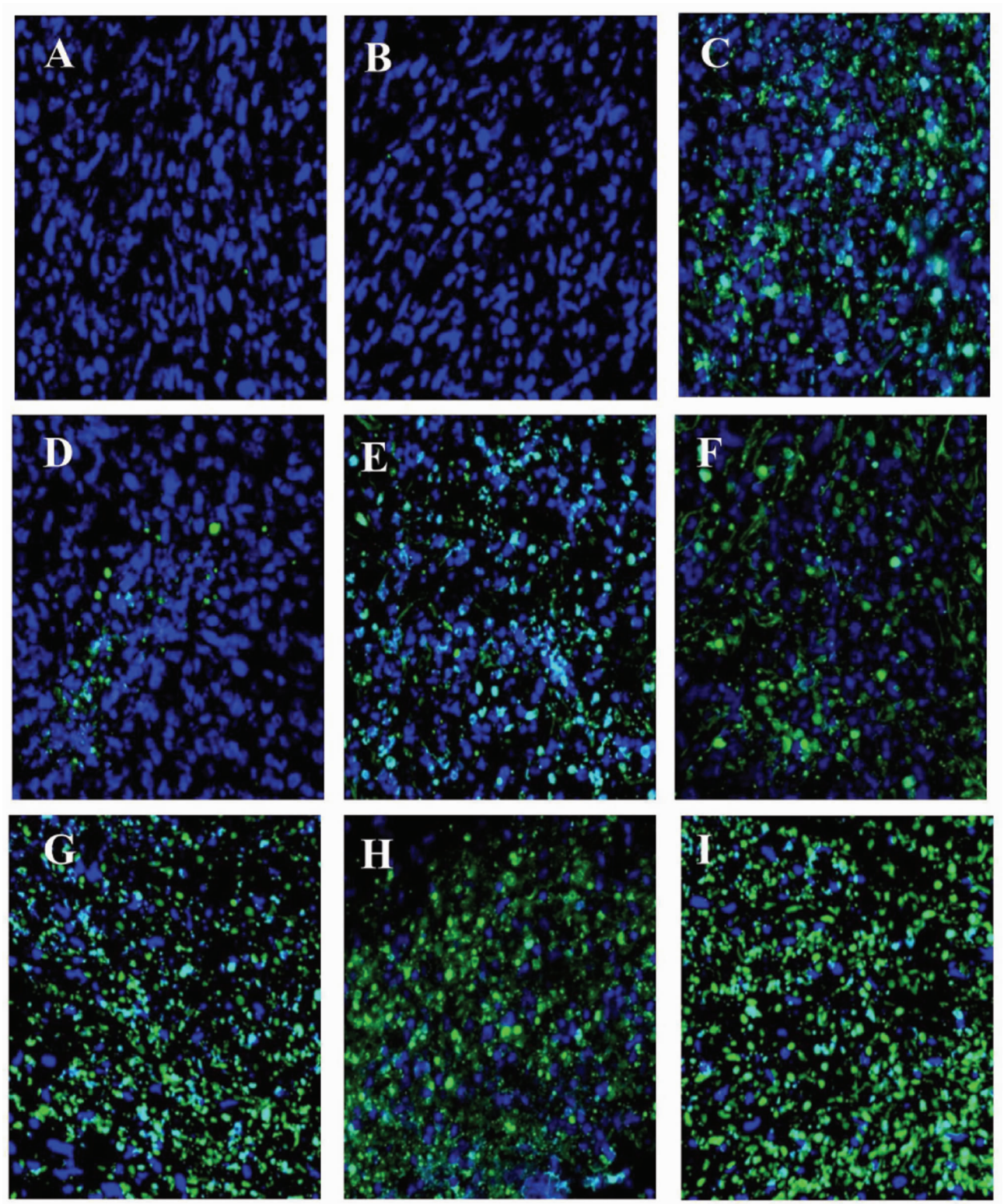


图 11　各组 4T1 荷瘤小鼠血清中 TNF－α、IL－6 及 IFN－γ 含量(n = 6)



注：A－I 依次为 NS、NS + Laser、ELE、ICG－NE－gel、ICG－ NE－gel + Laser、ICG－ELE－NE、ICG－ELE－NE + Laser、ICG－ELE－NE－gel、ICG－ELE－NE－gel + Laser。

图 9 各组 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织 H&E 病理组织切片



注：A－I 依次为 NS、NS + Laser、ELE、ICG－NE－gel、ICG－NE－gel + Laser、ICG－ELE－NE、ICG－ELE－NE + Laser、ICG－ELE－NE－gel、ICG－ELE－NE－gel + Laser。

图 10 各组荷瘤小鼠肿瘤组织 TUNEL 病理组织切片