叶酸修饰的克班宁纳米粒联合超声辐照对M109细胞的体内外靶向作用及抗肿瘤机制Δ

张海亮[1,2*]，赵笑雨[1]，梅佳华[3]，潘　蕊[1,2]，唐钧泽[1]，喻　锟[1]，薛　蕊[3]，李晓飞[4]，程　欣[1,2,5#]（1.云南中医药大学中药学院，昆明　650500；2.云南省傣医药与彝医药重点实验室，昆明　650500；3.云南中医药大学第一临床医学院，昆明　650500；4.云南中医药大学科学技术处，昆明　650500；5.云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室，昆明　650500）

中图分类号　R944　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2025）14-1730-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2025.14.07

摘　要　目的　考察叶酸修饰的克班宁纳米粒（FA-Cre@PEG-PLGA NPs，以下简称“NPs”）联合超声辐照对M109细胞的体内外靶向作用，初步探讨其抗肿瘤机制。**方法**　采用CCK-8法检测NPs联合超声辐照对M109细胞的增殖抑制作用，筛选最佳超声时间。以肺癌A549细胞为对照，通过游离叶酸阻断实验和细胞摄取实验，评估NPs联合超声辐照对M109细胞的叶酸靶向性。利用细胞划痕实验、Transwell小室实验和流式细胞术，检测给药后1 h联合超声辐照下，NPs对M109细胞迁移、侵袭、凋亡、周期及细胞内活性氧（ROS）水平的影响；使用荧光倒置显微镜观察线粒体膜电位（MMP）变化。构建M109细胞的小鼠皮下瘤模型，通过小动物活体成像技术考察NPs联合超声辐照的体内肿瘤靶向性。**结果**　NPs联合超声辐照能明显抑制M109细胞的增殖，最佳超声时间点为给药后1 h。游离叶酸可以拮抗NPs对M109细胞的增殖抑制作用，联合超声辐照能部分逆转这一拮抗作用。与A549细胞比较，M109细胞对NPs的摄取能力更强（$P<0.01$），超声辐照可以促进细胞摄取。NPs联合超声辐照可以抑制M109细胞的迁移与侵袭，并将细胞阻滞于G_0/G_1和G_2/M期。与对照组比较，NPs不同质量浓度（100、200、300 μg/mL）组M109细胞的凋亡率、ROS水平均显著升高（$P<0.01$），MMP均显著降低（$P<0.01$）。与不超声组比较，给药后0 h超声组小鼠肿瘤部位的荧光强度及肿瘤靶向指数均显著增加（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　NPs联合超声辐照对M109细胞具有较强的体内外靶向性，其抗肿瘤机制包括抑制细胞迁移与侵袭、阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡等。

关键词　叶酸修饰纳米粒；超声辐照；M109细胞；肿瘤靶向性；抗肿瘤机制

Targeting effect and anti-tumor mechanism of folic acid-modified crebanine nanoparticles combined with ultrasound irradiation on M109 cells *in vitro* and *in vivo*

ZHANG Hailiang[1,2], ZHAO Xiaoyu[1], MEI Jiahua[3], PAN Rui[1,2], TANG Junze[1], YU Kun[1], XUE Rui[3], LI Xiaofei[4], CHENG Xin[1,2,5] (1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Kunming 650500, China; 3. First Clinical Medical College, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 4. Science and Technology Office, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 5. Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology in University of Yunnan Province, Kunming 650500, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the targeting effect of folic acid-modified crebanine nanoparticles (FA-Cre@PEG-PLGA NPs, hereinafter referred to as “NPs”) combined with ultrasound irradiation on M109 cells *in vitro* and *in vivo* after administration, and explore the anti-tumor mechanism. **METHODS** CCK-8 assay was used to detect the inhibitory effect of NPs combined with ultrasound irradiation on the proliferation of M109 cells, and the best ultrasound time was selected. Using human lung cancer A549 cells as a control, the targeting of NPs combined with ultrasound irradiation to M109 cells was evaluated by free folic acid blocking assay and cell uptake assay. The effects of NPs combined with ultrasound irradiation on the migration, invasion, apoptosis, cell cycle and reactive oxygen species (ROS) levels of M109 cells were detected by cell scratch test, Transwell chamber test and flow cytometry at 1 h after administration; the changes of mitochondrial membrane potential (MMP) were observed by fluorescence inverted microscope. A mouse subcutaneous tumor model of M109 cells

Δ **基金项目** 国家自然科学基金项目（No.82060723）；云南省科学技术厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项（No.202001AZ070001-008）；云南省傣医药与彝医药重点实验室开放课题（No.202210SS2206）；云南省教育厅科学研究基金项目（No.2024Y345）

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药药剂学。E-mail：958401536@qq.com

通信作者 副教授，硕士生导师，博士。研究方向：药物新剂型、纳米医药。E-mail：chengxin920@126.com

was constructed, and the *in vivo* tumor targeting of NPs combined with ultrasound irradiation was investigated by small animal *in vivo* imaging technology. **RESULTS** NPs combined with ultrasound irradiation could significantly inhibit the proliferation of M109 cells, and the optimal ultrasound time was 1 h after administration. The free folic acid could antagonize the inhibitory effect of NPs on the proliferation of M109 cells, and combined with ultrasound irradiation could partially reverse this antagonism. Compared with A549 cells, the uptake rate of NPs in M109 cells was significantly higher ($P<0.01$), and ultrasound irradiation could promote cellular uptake. NPs combined with ultrasound irradiation could inhibit the migration and invasion of M109 cells and block the cell cycle in the G_0/G_1 and G_2/M phases. Compared with control group, the apoptosis rate of M109 cells and ROS level were increased significantly ($P<0.01$), while the MMP decreased significantly ($P<0.01$) in the different concentration (100, 200, 300 μg/mL) groups of M109 cells. Compared with the mice in non-ultrasound group, the fluorescence intensity and tumor-targeting index of the tumor site in the 0 h ultrasound group were significantly enhanced ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** NPs combined with ultrasound irradiation have a strong targeting effect on M109 cells *in vitro* and *in vivo*, the anti-tumor mechanism includes inhibiting cell migration and invasion, blocking cell cycle, and inducing apoptosis.

KEYWORDS folic acid-modified nanoparticles; ultrasonic irradiation; M109 cells; tumor targeting; anti-tumor mechanism

肺癌是世界范围内发病率和病死率最高的一种恶性肿瘤，尚无理想治疗手段[1]。智能纳米载药系统是治疗肿瘤的一种新方法，其表面通常会修饰肿瘤特异性配体[如抗体、多肽、转铁蛋白和叶酸（folic acid，FA）等]，能响应特定的外部或内部刺激（如酶、pH、温度、光学和磁性等），使纳米粒靶向到肿瘤部位，用于肿瘤的精准治疗[2]。FA具有廉价易得、安全无毒、相对分子质量小的优势，与叶酸受体（folate receptor，FR）具有高度的亲和力，而FR存在于大多数肿瘤细胞表面，在正常机体细胞中不表达或很少表达，因此FA常被作为理想的肿瘤主动靶向配体[3]。声动力疗法是一种非入侵性的治疗方法，使用的超声波具有良好的组织穿透能力，且安全无创、可控性强，在肿瘤的诊断和治疗方面均具有较好的应用前景[4]。超声波的空化效应会导致血管内皮细胞间隙增大，从而提高细胞膜的通透性，使更多的纳米粒进入肿瘤组织，增强肿瘤治疗效果[5－6]。因此，纳米粒联合声动力疗法越来越多地应用于肿瘤的治疗。

克班宁（crebanine，Cre）是从防己科千金藤属植物云南地不容 *Stephania Yunnanensis* H.S.Lo及其他几种同属植物中提取得到的异喹啉类阿朴菲型生物碱[7]。研究发现，Cre对多种肿瘤细胞均具有一定的抑制作用[8－9]。然而Cre毒性大、水溶性差、半衰期短的缺点限制了其临床应用。为解决以上问题，本课题组前期制备了FA修饰的Cre纳米粒（FA-Cre@PEG-PLGA NPs，以下简称“NPs”），其以FA修饰的聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物（PEG-PLGA-FA）为外壳，内部包载药物Cre、荧光染料（DiR）和液态氟碳（PFP）。NPs在提高Cre生物利用度的同时使其具有主动靶向肿瘤细胞的能力；而且与Cre原药相比，NPs联合超声辐照具有更好的体外抗肿瘤作用[10]。在此基础上，本研究通过细胞实验及活体成像实验探究NPs联合超声辐照对小鼠肺癌M109细胞的体内外靶向作用，并初步探讨其抗肿瘤机制，以期为后续体内药效学研究及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有M90 SCI型兽用彩色多普勒超声系统（深圳迈瑞动物医疗科技股份有限公司）、Varioskan LUX型多功能酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）、MF52-N型倒置荧光显微镜（广州市明美光电技术有限公司）、FACSCelesta型流式细胞仪（美国BD公司）、IVIS Lumina Series Ⅲ型小动物活体成像仪（美国PerkinElmer公司）、BPN-190CH型二氧化碳培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）、HH-2型恒温水浴锅（常州国华电器有限公司）、L550型低速大容量离心机（上海卢湘仪离心机仪器有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

NPs[Cre含量为6 g/L、包封率为83.78%、粒径为（247.67±2.49）nm、Zeta电位为（－9.40±0.54）mV]和空白NPs（不载Cre）均由云南中医药大学药剂实验室自制；胎牛血清、青霉素-链霉素、DMEM培养基、磷酸盐缓冲液（PBS）均购自上海达特希尔生物科技有限公司；超声耦合胶购自天津津亚科技发展有限公司；CCK-8试剂盒（批号ATWD07091）购自亚科因（武汉）生物技术有限公司；Matrigel基质胶购自美国Corning公司；FA（批号CR2204101，纯度98%）、DAPI染料（批号CR2307030）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；细胞周期检测试剂盒（批号2406263）购自武汉普美克生物技术有限公司；细胞凋亡试剂盒（批号MA0220-2）购自大连美仑生物技术有限公司；活性氧（reactive oxygen species，ROS）检测试剂盒（批号011124240515）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；JC-10线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，MMP）检测试剂盒（批号240007002）购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 细胞株

小鼠肺癌M109细胞购自湖南丰晖生物科技有限公司；人肺癌A549细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.4 实验动物

SPF级BALB/c小鼠15只，4周龄，雄性，体重14～16 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，生产许可证号：SCXK（湘）2021-0002。小鼠饲养于云南中医药大学实验动物中心，饲养于温度为22～25 ℃、相对湿度为50%～70%、12 h光照与12 h黑暗交替的环境中。本研究方案经云南中医药大学动物实验伦理审查委员会批准（批准号：R-062024008）。

2 方法

2.1 细胞培养

将M109和A549细胞接种于含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM完全培养基中，置于37 ℃、5%CO_2的恒温培养箱中培养。当细胞汇合率达80%～90%时传代，使用处于对数生长期的细胞进行实验。

2.2 给药后超声时间点的筛选

将M109细胞以每孔1×10^4个接种于96孔板中，常规培养24 h，设置不超声组和给药后0、1、2 h超声组。每组分别加入不同质量浓度的NPs（50、100、150、200、250、300、350、400 μg/mL，以Cre计；根据预实验及文献[10]确定质量浓度），每个质量浓度设置5个复孔；同时设置对照孔和空白孔。除不超声组外，其余3组均在对应时间点联合超声辐照（超声探头垂直于孔板底面，每孔超声2 min，下同）。培养24 h后，用PBS清洗1次，每孔加入新配的含10%CCK-8试剂的完全培养基100 μL，放入培养箱中培养2 h，用酶标仪在450 nm波长处检测吸光度（A）值，计算细胞增殖抑制率：细胞增殖抑制率（%）=（$A_{对照}-A_{实验}$）/（$A_{对照}-A_{空白}$）×100%。

2.3 游离FA对M109、A549细胞的阻断实验

称取FA粉末10 mg，加入1 mL磷酸氢二钠水溶液（pH 9.0）充分溶解，用DMEM完全培养基分别稀释至0、10、100、1 000 μg/mL，再用磷酸二氢钠水溶液调节至pH=7后备用。分别将M109和A549细胞以每孔1×10^4个接种于96孔板中，常规培养24 h，设置游离FA组和游离FA+NPs（NPs质量浓度为200 μg/mL，以Cre计）组，两组的FA质量浓度均为0、10、100、1 000 μg/mL（根据预实验结果确定质量浓度），每组设置5个复孔。两组细胞分别进行给药后不超声和给药后联合超声辐照处置（按“2.2”项下筛选的超声时间点进行超声辐照，下同），放入培养箱中继续培养24 h，按“2.2”项下方法计算细胞增殖抑制率。

2.4 M109、A549细胞对NPs的体外摄取实验

2.4.1 倒置荧光显微镜观察

分别将M109和A549细胞以每孔5×10^5个接种于6孔板中，常规培养24 h，加入2 mL含空白NPs的完全培养基（DiR质量浓度为25 μg/mL），分为不超声组和超声组，每组设置3个复孔。继续培养3、6、12 h后，用PBS清洗3次，加入400 μL即用型DAPI染色液（质量浓度为2 μg/mL），室温避光染色10 min，再用PBS清洗3次，最后用倒置荧光显微镜观察细胞对NPs的摄取情况（细胞膜被DiR染色，呈红色；细胞核被DAPI染色，呈蓝色）。

2.4.2 NPs摄取率检测

分别将M109和A549细胞以每孔1×10^4个接种于黑色96孔板中，常规培养48 h，分为空白组（不含细胞）、对照组（空白培养基）、不超声实验组和超声实验组，每组设置5个复孔。除对照组外，其余各组每孔加入100 μL含空白NPs的完全培养基。给药后继续培养3、6、12 h，用PBS清洗3次，用多功能酶标仪（激发波长为750 nm，发射波长为782 nm）测定各孔荧光强度，计算细胞对NPs的摄取率：摄取率（%）=（实验组荧光强度－对照组荧光强度）/空白组荧光强度×100%。

2.5 M109细胞迁移和侵袭能力检测

2.5.1 细胞迁移能力检测

采用细胞划痕实验进行检测。将M109细胞以每孔1×10^6个接种于底部用黑色马克笔画有3条平行线的6孔板中，培养24 h，使用200 μL枪头垂直在孔板中划竖痕，使之与黑色标记线相交并垂直，用PBS清洗1次，除去划下的细胞团块。随后更换培养基为含2%胎牛血清的DMEM培养基，设置对照组（空白培养基）和NPs低、中、高浓度（100、200、300 μg/mL，根据预实验结果确定质量浓度）组，每组设置3个复孔。给药并联合超声辐照后，使用倒置显微镜拍照记录同一划痕在0、24 h的变化。使用Image J软件测量划痕宽度，并计算细胞划痕愈合率：细胞划痕愈合率（%）=（0 h划痕宽度－24 h划痕宽度）/0 h划痕宽度×100%。

2.5.2 细胞侵袭能力检测

采用Transwell小室实验进行检测。将Matrigel基质胶与无血清培养基按1∶8的体积比混匀，取60 μL滴加到Transwell小室上室铺匀，将小室放入24孔板内，将培养板在培养箱中放置3 h成膜。将M109细胞以每孔5×10^5个接种于6孔板中，培养24 h，设置对照组（空白培养基）和NPs低、中、高浓度（100、200、300 μg/mL，根据预实验结果确定质量浓度）组，每组设置3个复孔。给药并联合超声辐照，培养24 h后，离心收集细胞，用PBS清洗1次，用无血清培养基重悬细胞并调整细胞密度为1×10^5个/mL；取200 μL细胞悬液接种到Transwell小室上室，下室加入500 μL完全培养基，置于培养箱中培养48 h。使用棉签抹掉未侵袭的细胞，以4%多聚甲醛溶液固定20 min，0.1%结晶紫染液染色10 min，用PBS清洗后，用倒置荧光显微镜观察细胞侵袭情况并计数。细胞侵袭数量越多说明侵袭能力越强。

2.6 M109细胞凋亡检测

将M109细胞按“2.5.2”项下方法分组、给药及联合超声辐照。24 h后，使用不含EDTA的胰酶消化细胞，用

PBS清洗1次，于流式管中加入500 μL 1×Binding Buffer重悬细胞，每管加入5 μL Annexin Ⅴ-FITC和10 μL PI，室温避光培养10 min，使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.7 M109细胞周期分布检测

将M109细胞按“2.5.2”项下方法分组、给药及联合超声辐照。24 h后，消化并收集细胞，用PBS清洗1次，加入预冷的70%乙醇1 mL，于4 ℃固定过夜。次日离心，弃上清，加入预配的染色工作液（PI+RNaseA）500 μL并混匀，37 ℃避光培养30 min，使用流式细胞仪检测细胞周期分布。

2.8 M109细胞内ROS水平检测

将M109细胞按“2.5.2”项下方法分组、给药及联合超声辐照。24 h后，消化收集细胞，用PBS清洗1次，加入500 μL稀释的DCFH-DA染色液重悬细胞，培养箱内培养20 min（每隔5 min轻摇混匀1次，使探针和细胞充分接触）。培养结束后，用PBS清洗1次，加入500 μL PBS重悬细胞，然后转移至流式管中，使用流式细胞仪检测细胞荧光强度。荧光强度越大表明细胞内ROS水平越高。

2.9 M109细胞内MMP变化检测

将M109细胞按“2.5.2”项下方法分组、给药及联合超声辐照。24 h后，消化并收集细胞，用PBS清洗1次，加入1 mL JC-10染色工作液并混匀，于37 ℃下培养20 min。离心，弃上清，用预冷的JC-10染色缓冲液洗涤细胞2次，加入2 mL完全培养基，用倒置荧光显微镜观察并拍照。使用Image J软件分析各组细胞的红/绿荧光比值（红/绿荧光比值＝红色荧光强度/绿色荧光强度），比值越低表明细胞内MMP越低。

2.10 小动物活体成像观察

调整M109细胞的密度为5×10^7个/mL，取100 μL细胞悬液，注射于小鼠右腋下，构建小鼠M109皮下瘤模型。待肿瘤体积长至（200±20）mm^3时，选取体重及肿瘤体积无显著差异的小鼠随机分为不超声组、给药后0 h超声组（给药后立即超声）和给药后1 h超声组，每组5只。每只小鼠尾静脉注射0.2 mL NPs（DiR质量浓度为0.5 mg/mL），超声组给药后使用超声探头对肿瘤部位超声20 min。分别于给药前和给药后0.5、1、1.5、2、4、8、24、48、72、96、120 h进行活体荧光拍摄，观察各组小鼠的体内荧光分布情况。使用Living Image软件对图像进行处理，量化荧光强度。根据肿瘤靶向指数（tumor-targeting index，TTI）以及梯形法计算的TTI-时间曲线下面积（area under the TTI-time curve，AUTC）来评价NPs在小鼠体内的肿瘤靶向能力[11]。TTI（%）＝肿瘤区域荧光强度/全身荧光强度×100%。

2.11 统计学方法

使用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析。所有数据均以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 给药后超声时间点的筛选结果

总体而言，给药后联合超声辐照能提高NPs对M109细胞的增殖抑制率（$P<0.05$）。与不超声组或给药后0 h超声组比较，给药后1、2 h超声组的细胞杀伤力更强（$P<0.05$）；但与给药后1 h超声组比较，给药后2 h超声组细胞增殖抑制率的提升不明显（$P>0.05$）。因此，本研究确定后续体外细胞实验的超声时间点为给药后1 h。结果见表1。

表1 给药后不同时间点超声对M109细胞增殖抑制率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

NPs质量浓度/（μg/mL）	不超声组	给药后0 h超声组	给药后1 h超声组	给药后2 h超声组
50	0.69±0.14	2.60±0.24[a]	6.14±0.86[ab]	6.04±1.70[ab]
100	2.39±0.48	5.04±0.82[a]	8.93±1.78[ab]	8.97±3.21[ab]
150	24.86±3.65	28.57±5.32	35.14±3.65[ab]	34.51±3.04[ab]
200	49.98±1.34	59.23±5.53[a]	66.97±3.53[ab]	67.84±6.45[ab]
250	68.61±3.62	76.32±4.56[a]	81.50±2.90[ab]	81.78±3.97[ab]
300	78.52±2.56	80.05±5.04[a]	85.17±2.99[ab]	84.79±2.46[ab]
350	81.74±1.96	82.32±2.86	86.96±4.01[ab]	88.18±1.19[ab]
400	85.00±2.49	85.83±2.93	91.27±3.05[ab]	91.13±4.07[ab]

a：与不超声组比较，$P<0.05$；b：与给药后0 h超声组比较，$P<0.05$。

3.2 游离FA对M109、A549细胞的阻断结果

游离FA组2种细胞的增殖抑制率均在−3%～3%之间，说明在联合或不联合超声辐照的条件下，游离FA在0～1 000 μg/mL质量浓度范围内对2种细胞的生长均无明显影响。游离FA+NPs组在不超声时，与同组的0 μg/mL比较，随着游离FA质量浓度的增加（10 μg/mL质量浓度除外），NPs对M109细胞的增殖抑制率下降（$P<0.05$），而对A549细胞无明显影响（$P>0.05$）；与不超声比较，给药后1 h超声时，在各游离FA质量浓度下，2种细胞的增殖抑制率均显著升高（$P<0.01$）。结果见表2。

表2 游离FA对M109、A549细胞增殖抑制的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	FA质量浓度/（μg/mL）	M109细胞增殖抑制率/%		A549细胞增殖抑制率/%	
		不超声	给药后1 h超声	不超声	给药后1 h超声
游离FA组	0	1.44±0.41	1.63±0.72	2.35±0.88	−2.42±0.18
	10	−2.86±0.84	2.12±0.84	1.58±0.28	2.03±0.53
	100	1.24±0.40	−2.10±0.75	−2.45±0.34	−2.58±0.82
	1 000	−2.82±0.90	1.24±0.49	2.31±0.44	1.35±0.43
游离FA+NPs组	0	55.72±4.83	66.75±4.04[a]	13.02±3.51	21.08±4.78[a]
	10	54.81±5.96	66.61±3.73[a]	13.56±2.21	19.13±4.31[a]
	100	49.47±4.28[b]	60.90±3.47[ab]	12.64±3.11	19.29±2.87[a]
	1 000	30.34±5.80[b]	47.54±3.82[ab]	12.21±3.55	20.61±2.38[a]

a：与同组不超声时比较，$P<0.01$；b：与游离FA+NPs组的0 μg/mL比较，$P<0.05$。

3.3 M109、A549细胞对NPs的摄取结果

3.3.1 倒置荧光显微镜观察结果

随着培养时间的延长，2种细胞的DiR荧光强度均呈上升趋势，且无论联合超声辐照与否，M109细胞在各个时间点的DiR荧光强度均明显强于A549细胞。联合超声辐照后，2种细胞在各时间点的DiR荧光强度均增加。结果见图1（图1仅展示12 h时的显微图，全部时间点的图片可扫描本文首页二维码，进入“增强出版”页面查看附图1）。

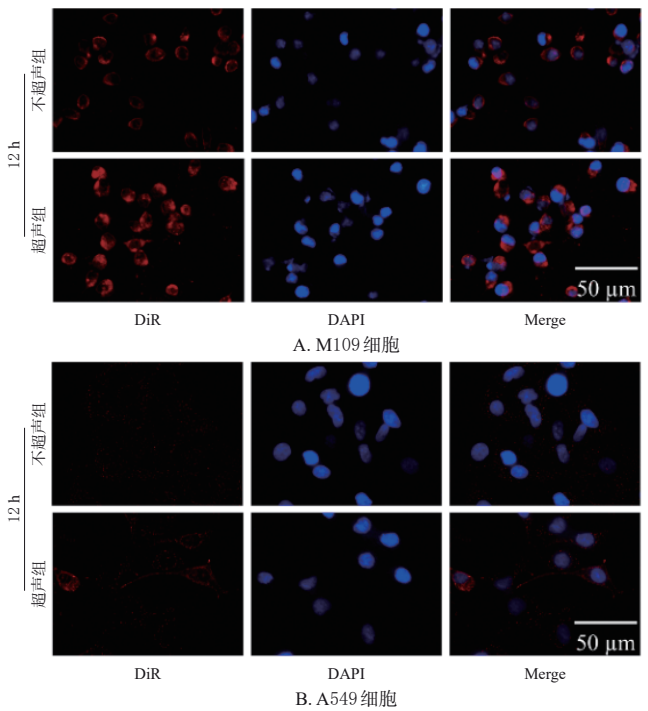


图1 M109、A549细胞对NPs摄取的显微图（DiR染色）

3.3.2 NPs摄取率检测结果

在不超声实验组中，随着培养时间的延长，2种细胞的摄取率均逐渐升高；而在相同培养时间下，M109细胞的摄取率显著高于A549细胞（$P<0.01$）。与不超声实验组同类型细胞比较，超声实验组的2种细胞在各培养时间点下的摄取率均有所提高，其中M109细胞在培养3 h时和A549细胞在培养12 h时的摄取率差异均有统计学意义（$P<0.05$）。这表明联合超声辐照能促进细胞摄取，与倒置荧光显微镜观察结果一致。结果见表3。

表3 培养不同时间后M109、A549细胞对NPs的摄取率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$，%）

培养时间/h	不超声实验组		超声实验组	
	A549细胞	M109细胞	A549细胞	M109细胞
3	8.36±0.72	18.52±0.46[a]	9.21±0.95	21.59±0.50[b]
6	19.53±0.80	43.52±0.95[a]	19.94±0.53	45.95±2.74
12	21.60±0.74	61.08±2.48[a]	26.44±1.64[b]	62.27±3.18

a：与不超声实验组A549细胞比较，$P<0.01$；b：与同类型细胞、同培养时间的不超声组比较，$P<0.05$。

3.4 M109细胞迁移与侵袭实验结果

与对照组[细胞划痕愈合率（71.80±6.22）%、细胞侵袭数（442.00±43.31）个]比较，NPs低、中、高浓度组的细胞划痕愈合率[分别为（62.20±2.63）%、（40.79±5.51）%、（29.84±4.93）%]和细胞侵袭数[分别为（217.00±7.21）、（163.67±9.29）、（92.67±8.14）个]均显著降低或减少（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图2、图3。

3.5 M109细胞凋亡及细胞周期检测结果

与对照组比较，NPs低、中、高浓度组细胞凋亡率均显著升高（$P<0.01$）。与对照组比较，NPs低、中、高浓度组S期细胞比例均显著降低（$P<0.01$），而G_0/G_1和G_2/M

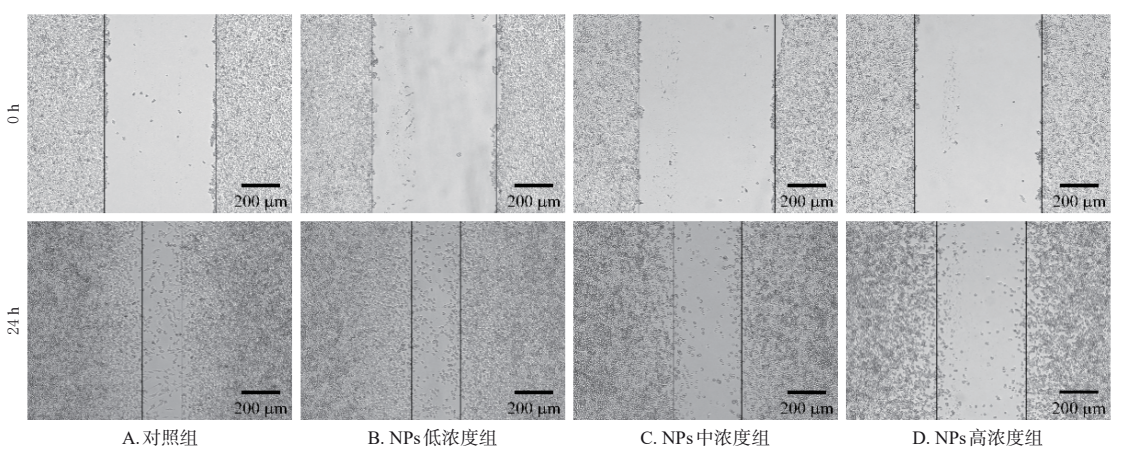


图2 各组M109细胞划痕实验的显微图

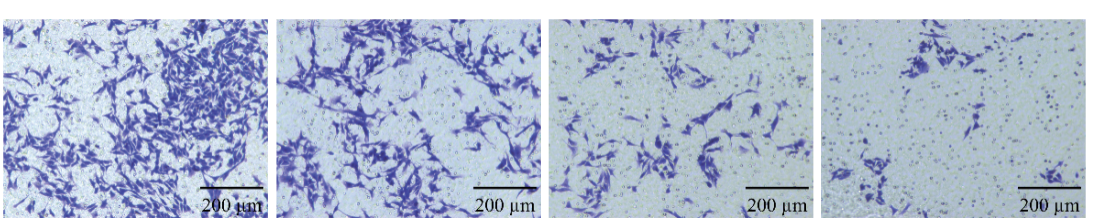


图3 各组M109细胞Transwell小室实验的显微图（结晶紫染色）

期细胞比例均明显升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表4（流式图可扫描本文首页二维码，进入“增强出版”页面查看附图2、附图3）。

表4　各组M109细胞的凋亡率及细胞周期占比检测结果比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

组别	细胞凋亡率	细胞周期占比		
		G_0/G_1期	S期	G_2/M期
对照组	3.12±0.34	41.13±0.64	41.93±5.51	16.20±4.59
NPs低浓度组	17.31±0.93[a]	54.93±2.15[a]	22.67±0.81[a]	21.20±1.31[b]
NPs中浓度组	60.10±0.53[a]	50.13±1.19[a]	19.93±2.12[a]	28.67±0.84[a]
NPs高浓度组	83.33±0.86[a]	53.33±0.31[a]	13.33±2.86[a]	32.43±2.45[a]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与对照组比较，$P<0.05$。

3.6　M109细胞内ROS水平及MMP变化检测结果

与对照组比较，NPs低、中、高浓度组细胞内ROS水平均显著升高（$P<0.01$），红/绿荧光比值均显著降低（$P<0.01$）。结果见表5。

表5　各组M109细胞的ROS荧光强度、红/绿荧光比值比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	ROS荧光强度	红/绿荧光比值
对照组	468.00±49.67	2.70±0.30
NPs低浓度组	986.33±51.05[a]	1.63±0.35[a]
NPs中浓度组	3 841.00±25.51[a]	0.68±0.08[a]
NPs高浓度组	4 423.67±161.81[a]	0.64±0.05[a]

a：与对照组比较，$P<0.01$。

3.7　小动物活体成像观察结果

各组小鼠肿瘤部位在给药后120 h仍有较强的红色荧光，表明NPs能长时间滞留在肿瘤部位。与不超声组比较，给药后0 h超声组小鼠肿瘤部位的荧光强度及各时间点下的TTI均显著增加（$P<0.05$或$P<0.01$）；而给药后1 h超声组与不超声组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。给药后0 h超声组和给药后1 h超声组小鼠的AUTC分别为不超声组的1.14倍和0.99倍，给药后0 h超声组小鼠肿瘤部位的荧光强度、TTI和AUTC均高于不超声组和给药后1 h超声组。这表明给药后0 h联合超声辐照能增加NPs在肿瘤部位的蓄积，延长滞留时间，具有更好的肿瘤靶向效果；而给药后1 h超声组结果与不超声组类似，对NPs靶向性的提升作用不明显。结果见图4、图5（图4仅展示0、2、24、72、120 h时的活体成像图，全部时间点的图片可扫描本文首页二维码，进入“增强出版”页面查看附图4）。

4　讨论

近年来，随着纳米载药技术及超声成像技术的发展，纳米粒联合超声辐照以其独特的优势成为了肺癌治疗的研究热点[12]。超声波的空化效应使肿瘤部位的细胞膜通透性增加，对纳米粒的摄取增多。这些纳米粒通常包载治疗药物、声敏剂或造影剂，在超声辐照的作用下，纳米粒子会剧烈振荡和膨胀，导致其破裂，使药物在肿瘤部位集中释放，增强肿瘤治疗效果[13]。本课题组前期制备的NPs具有较好的生物相容性及肿瘤靶向能力，

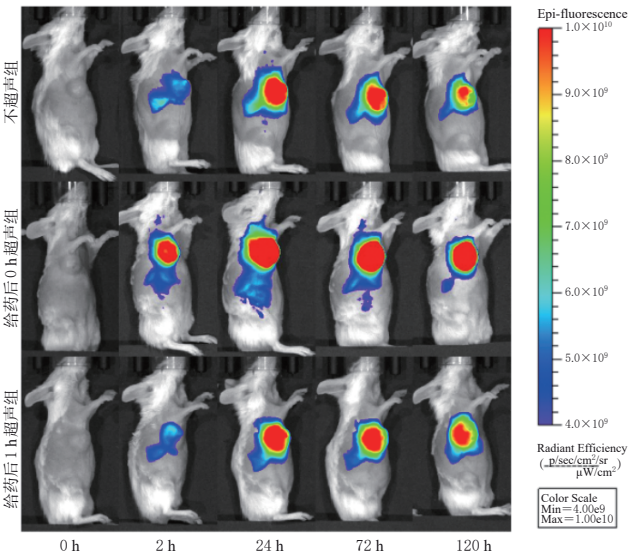
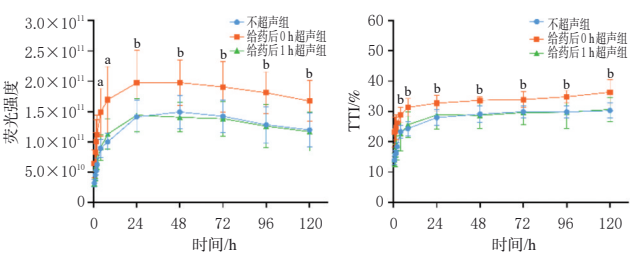


图4　各组小鼠在给药后不同时间点的活体成像结果图



A. 肿瘤区域DiR荧光强度曲线　　B. TTI曲线

a：与不超声组比较，$P<0.01$；b：与不超声组比较，$P<0.05$。

图5　活体荧光成像定量分析结果图（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

给药后联合超声辐照，不仅能促进肿瘤细胞对NPs的摄取，同时在超声波的机械效应和热效应作用下，NPs内部包载的PFP会由液态纳米乳滴转变为气体微泡，使NPs膨胀爆破并在肿瘤部位释药[14]，增强对肿瘤细胞的杀伤力。前期的体内实验表明，NPs联合超声辐照对肝癌小鼠具有较好的治疗效果[15—16]。

超声辐照能提高NPs对肿瘤细胞的增殖抑制作用。本研究显示，与给药后0 h超声比较，给药后1 h后再超声，可以使NPs有足够的时间通过FA的靶向作用而富集在肿瘤细胞表面及周围，此时联合超声辐照可以使NPs在肿瘤细胞周围瞬间爆破释药，增强对肿瘤细胞的杀伤力；给药后2 h超声与给药后1 h超声的细胞增殖抑制率比较，差异无统计学意义。笔者推测给药后1 h时与细胞表面FR结合的NPs接近饱和，故给药后2 h再超声与给药后1 h超声的结果差别不大。有研究发现，游离FA会占据人口腔癌KB细胞表面FR的位置，使KB细胞对FA修饰的纳米载药胶束的摄取减少[17]。本研究结果表明，游离FA能减弱NPs对M109细胞的增殖抑制作用，而对A549细胞几乎无影响；细胞摄取实验结果也表明，FR高表达的M109细胞对NPs的摄取率显著强于FR低表达的A549细胞。这提示NPs可能是通过FA介导的内吞作用进入细胞，具体的摄取机制有待进一步研究。

与体外细胞实验结果不同的是，活体成像结果表明，给药后0 h联合超声辐照具有更好的肿瘤靶向效果。对于体内实验来说，给药1 h后再超声，NPs会随着时间的延长，在体内各器官分布，被肝脏及其他组织大量截留，导致存在于血液循环中的NPs浓度降低、被动靶向能力减弱，故给药后1 h超声组小鼠体内的肿瘤靶向效果较给药后0 h超声组差。NPs在大鼠体内的药动学研究证实了这一推测：NPs经尾静脉注射后，在大鼠体内主要由肝脏代谢，随着给药后时间的延长，大鼠血浆中NPs的含量逐渐降低；给药后60 min后的NPs平均血药浓度较给药后5 min降低约37%[16]。因此，在后期进行体内药效学实验时建议给药后立即超声。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡，分为外源性凋亡和内源性凋亡（又称线粒体凋亡）。凋亡机制复杂，涉及多种信号通路，受到基因的精细调控，在肿瘤发展的过程中常伴有相关凋亡基因的异常表达[18]。ROS在细胞凋亡中发挥重要作用，过高的ROS水平会导致氧化应激，引起MMP降低，诱发线粒体膜通透性改变，使细胞色素C及其他因子释放到细胞质中，启动caspase级联反应，最终诱导细胞凋亡[19—20]。本研究结果显示，NPs联合超声辐照能诱导细胞产生ROS，降低MMP。这提示NPs联合超声辐照可能通过线粒体途径诱导细胞凋亡。

综上所述，NPs联合超声辐照对M109细胞具有较强的体内外靶向性；其抗肿瘤机制包括抑制细胞迁移与侵袭、诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期等。

参考文献

[1] 李凯，张俊华，张明妍，等. 中药治疗肺癌临床试验结局指标文献研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2021，23(8)：2593-2600.

[2] SUN L M，LIU H M，YE Y Q，et al. Smart nanoparticles for cancer therapy[J]. Signal Transduct Target Ther，2023，8(1)：418.

[3] YAO W，YAO J L，QIAN F F，et al. Paclitaxel-loaded and folic acid-modified PLGA nanomedicine with glutathione response for the treatment of lung cancer[J]. Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)，2021，53(8)：1027-1036.

[4] HOU R，LIANG X L，LI X D，et al. *In situ* conversion of rose Bengal microbubbles into nanoparticles for ultrasound imaging guided sonodynamic therapy with enhanced antitumor efficacy[J]. Biomater Sci，2020，8(9)：2526-2536.

[5] WU N，FAN C H，YEH C K. Ultrasound-activated nanomaterials for sonodynamic cancer theranostics[J]. Drug Discov Today，2022，27(6)：1590-1603.

[6] LIU S B，ZHANG Y，LIU Y，et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction remodels tumour microenvironment to improve immunotherapeutic effect[J]. Br J Cancer，2023，128(5)：715-725.

[7] 崔利利，孔淑君，王辉，等. PELGE-克班宁纳米粒在大鼠体内的组织分布及药动学研究[J]. 中国药房，2022，33(24)：2957-2961.

[8] TAN J J，XIANG Y L，XIONG Y G，et al. Crebanine induces ROS-dependent apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells via the AKT/FoxO3a signaling pathway [J]. Front Pharmacol，2023，14：1069093.

[9] 林铖吟，项士轩，陈乐陶陶，等. 克班宁通过DUSP5/ERK信号通路抑制胰腺癌细胞生长[J]. 温州医科大学学报，2024，54(8)：623-630.

[10] 潘蕊，张海亮，赵笑雨，等. 叶酸修饰的克班宁聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中草药，2023，54(20)：6643-6656.

[11] LIU H，MARQUEZ R T，WU X Q，et al. A non-intrusive evaluation method for tumor-targeting characteristics of nanomedicines based on *in vivo* near-infrared fluorescence imaging[J]. J Mater Chem B，2019，7(31)：4751-4757.

[12] ZHANG Y N，KHAN A R，YANG X Y，et al. A sonosensitiser-based polymeric nanoplatform for chemo-sonodynamic combination therapy of lung cancer[J]. J Nanobiotechnology，2021，19(1)：57.

[13] SHARMA D，LEONG K X，CZARNOTA G J. Application of ultrasound combined with microbubbles for cancer therapy[J]. Int J Mol Sci，2022，23(8)：4393.

[14] ZHU J J，WANG Z，XU X L，et al. Polydopamine-encapsulated perfluorocarbon for ultrasound contrast imaging and photothermal therapy[J]. Mol Pharm，2020，17(3)：817-826.

[15] 潘蕊，唐钧泽，张海亮，等. 叶酸修饰的PEG-PLGA克班宁纳米粒联合超声辐照对肝癌皮下瘤小鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2025，31(4)：217-225.

[16] CHENG X，PAN R，TANG J Z，et al. Preliminary study on pharmacokinetics and antitumor pharmacodynamics of folic acid modified crebanine polyethyleneglycol-polylactic acid hydroxyacetic acid copolymer nanoparticles[J]. Int J Nanomedicine，2024，19：10513-10536.

[17] 刘露，黄国俊，白宏震，等. 叶酸修饰壳聚糖纳米载药胶束的制备及其体外抗肿瘤效果研究[J]. 浙江大学学报(医学版)，2020，49(3)：364-374.

[18] PISTRITTO G，TRISCIUOGLIO D，CECI C，et al. Apoptosis as anticancer mechanism：function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies[J]. Aging(Albany NY)，2016，8(4)：603-619.

[19] HAYES J D，DINKOVA-KOSTOVA A T，TEW K D. Oxidative stress in cancer[J]. Cancer Cell，2020，38(2)：167-197.

[20] HUANG R，CHEN H，LIANG J Y，et al. Dual role of reactive oxygen species and their application in cancer therapy [J]. J Cancer，2021，12(18)：5543-5561.

（收稿日期：2025-03-06　修回日期：2025-06-11）

（编辑：林　静）