



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：雷帕霉素光敏纳米盘的制备及体外抗卵巢癌活性评价
作者：张魁枝，卢光照，鲁莹，余史丹，张黎
收稿日期：2025-11-12
网络首发日期：2026-05-19
引用格式：张魁枝，卢光照，鲁莹，余史丹，张黎. 雷帕霉素光敏纳米盘的制备及体外抗卵巢癌活性评价[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260519.1640.006>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

雷帕霉素光敏纳米盘的制备及体外抗卵巢癌活性评价

张魁枝^{1,2,3}, 卢光照⁴, 鲁莹⁴, 余史丹⁵, 张黎^{1,2,3}

(¹安徽医科大学药学科学学院, 合肥 230032; ²安徽医科大学第二附属医院临床药理研究中心, 合肥 230601; ³海军军医大学第一附属医院临床研究中心, 上海 200433; ⁴海军军医大学药学系药剂学教研室, 上海 200433; ⁵中国人民解放军联勤保障部队第九〇六医院药剂科, 宁波 315000)

摘要 目的 制备负载雷帕霉素的光敏纳米盘, 并评价其体外抗卵巢癌活性。方法 采用薄膜水化法制备纳米盘, 通过动态光散射和透射电子显微镜表征其粒径、电位和形貌; 建立高效液相色谱法测定雷帕霉素含量, 并验证方法专属性、线性、精密度、重复性、稳定性与加样回收率。通过单线态氧检测探针与反向透析法, 分别评估了纳米盘在近红外光下的单线态氧生成与光控释药性能。通过检测细胞代谢活性, 评估纳米盘对人卵巢癌细胞 OVCAR-8 的杀伤作用。采用共聚焦显微镜观察与流式细胞术, 分别对纳米盘的细胞摄取行为及其内吞机制进行探究。**结果** 纳米盘粒径为 (63.66 ± 0.27) nm, 电位为 (-18.2 ± 2.4) mV, 稳定性良好。透射电镜结果显示其具有类球状或短棒状形态。雷帕霉素在 $0.2 \sim 40 \mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内峰面积线性良好 ($R^2=0.9999$), 精密度、重复性和回收率的相对标准偏差 (RSD) 均小于 5%。在近红外光照射下, 纳米盘可有效产生单线态氧; 同时, 单线态氧可诱导脂质膜氧化, 进而显著促进雷帕霉素的响应性释放 ($P<0.001$)。纳米盘本身无显著细胞毒性, 而经近红外光照射后对卵巢癌细胞的毒性显著增强。细胞摄取实验证实, 纳米盘主要通过网格蛋白介导的能量依赖型内吞途径进入细胞 ($P<0.001$), 光照后可触发药物释放。**结论** 成功制备雷帕霉素光敏纳米盘, 其在体外表现出显著的光控释药特性及增强的抗卵巢癌活性。

关键词 雷帕霉素; 光敏; 纳米盘; 高效液相色谱法; 卵巢癌; 抗肿瘤

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A

Preparation of rapamycin photosensitive nanodiscs and evaluation of their *in vitro* antitumor activity

Zhang Kuizhi^{1,2,3}, Lu Guangzhao⁴, Lu Ying⁴, Yu Shidan⁵, Zhang Li^{1,2,3}

2025-11-12 接收

基金项目: 上海市自然科学基金项目 (编号: 23ZR1477500)

作者简介: 张魁枝, 男, 硕士研究生;

张黎, 女, 研究员, 博士生导师, 通信作者, Email: lizhangpaper@163.com

(¹School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Clinical Pharmacology Research Center, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601; ³Clinical Research Center, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433; ⁴Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433; ⁵Department of Pharmacy, No. 906 Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Ningbo 315000)

Abstract Objective To prepare photosensitive nanodiscs loaded with rapamycin and evaluate their *in vitro* antitumor activity against ovarian cancer. **Methods** Nanodiscs were prepared by the thin-film hydration method, and their particle size, potential and morphology were characterized by dynamic light scattering and transmission electron microscopy. High performance liquid chromatography was established for the determination of rapamycin content, and the specificity, linearity, precision, repeatability, stability, and recovery rate of the method were verified. The singlet oxygen generation and light-controlled drug release properties of nanodiscs under near-infrared light were evaluated respectively by singlet oxygen detection probe and reverse dialysis method. The cytotoxicity of the nanodiscs against human ovarian cancer cells (OVCAR-8) was evaluated by detecting cell metabolic activity. Confocal microscopy and flow cytometry were used to investigate the cellular uptake and endocytosis mechanisms of the nanodiscs. **Results** The nanodiscs exhibited a hydrodynamic diameter of (63.66 ± 0.27) nm, a zeta potential of (-18.2 ± 2.4) mV, and demonstrated good stability. The results from transmission electron microscopy revealed that the nanodiscs exhibited spherical and short rod-like morphologies. The peak area of rapamycin showed good linearity in the concentration range of 0.2~40 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.9999$), and the relative standard deviations (RSDs) of precision, repeatability and recovery were all less than 5%. Under near-infrared light irradiation, the nanodiscs could effectively produce singlet oxygen. At the same time, the singlet oxygen generated could induce lipid membrane oxidation, which significantly promoted the responsive release of rapamycin ($P<0.001$). Nanodiscs had no obvious cytotoxicity, but the cytotoxicity to ovarian cancer cells was significantly enhanced after near-infrared irradiation. Cellular uptake experiments confirmed that the nanodiscs mainly entered cells through clathrin-mediated, energy-dependent endocytosis ($P<0.001$), with drug release triggered by light exposure. **Conclusion** Rapamycin photosensitive nanodiscs were successfully prepared, which showed significant light-controlled release properties and enhanced anti-ovarian cancer activity *in vitro*.

Key words rapamycin; photosensitive; nanodisc; high performance liquid chromatography; ovarian cancer; antitumor

Fund program Natural Science Foundation of Shanghai (No. 23ZR1477500)

Corresponding author Zhang Li, E-mail: lizhangpaper@163.com

嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T cells, CAR-T) 免疫疗法在血液系统肿瘤治疗中疗效显著, 但其脱靶效应、细胞因子风暴等不良反应严重限制其临床应用^[1-4]。On-switch CAR-T 系统^[5, 6]的研发为解决该问题提供了思路。雷帕霉素 (rapamycin, RAPA) 作为该系统的其中一种调控小分子, 可介导 CAR 基因组装并激活 T 细胞杀伤功能, 却因全身性分布难以在卵巢癌肿瘤部位有效富集, 无法实现 CAR-T 细胞的局部特异性激活, 脱靶问题仍未解决^[7]。脂质纳米盘兼具稳定性高、生物相容性良好的特点, 独特的盘状形态与小尺寸使其能够有效穿透致密肿瘤基质, 实现药物向肿瘤深部的递送^[8, 9]; 光响应技术则可实现药物的时空精准释放^[10-12], 二者结合为改善雷帕霉素的肿瘤递送效率提供了新方向。本研究构建负载雷帕霉素的光敏纳米盘, 通过近红外光触发实现药物时空调控释放, 系统表征其理化性质与光控释药性能, 明确其细胞摄取机制及体外抗卵巢癌活性, 旨在为雷帕霉素局部调控 On-switch CAR-T 治疗卵巢癌提供新型纳米载药系统, 为后续卵巢癌免疫联合纳米治疗的研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

2-油酰-1-棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPC) (货号: O824213)、胆固醇 (99%生物技术级, 货号: C6213) 和 1,2-二亚油酰基-3-sn-磷脂酰胆碱 (1,2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC) (货号: L875640) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(methoxy(p6polyethylene glycol)-2000), DSPE-PEG2 000) (货号: F01008) 购自艾伟拓 (上海) 医药科技有限公司; 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25-八丁氧基酞菁钯 [1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25-octabutoxypalladium phthalocyanine, PdPC(OBu)₈] (货号: R-TJ-004) 购自西安瑞禧生物科技有限公司; 香豆素 6 (coumarin 6, Ce6) (含量 98%, 货号: 442631) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; RAPA (含量 99.94%, 货号: HY-10219) 和盐酸阿米洛利 (含量 99.96%, 货号: HY-B0285) 购自美国 MedChemExpress 公司; RPMI 1640 培养基 (货号: L210KJ) 和 DMEM 培养基 (货号: L110KJ) 购自上海源培生物科技股份有限公司; 胎牛血清 (货号: A5669701) 购自美国 Thermo Fisher Scientific

公司；细胞计数试剂盒-8 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) (货号: C0038) 和二氢乙锭 (dihydroethidium, DHE) 超氧阴离子检测试剂盒 (货号: S0064S) 购自上海碧云天生物技术有限公司；非律平(含量 97.0%, 货号: MB1848)、渥曼青霉素(含量 98.0%, 货号: MB5799) 和金雀异黄酮 (含量 98.0%, 货号: MB2170) 购自大连美仑生物技术有限公司；盐酸氯丙嗪 (含量 95.0%, 货号: C184839) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 主要仪器

高效液相色谱-质谱仪 (美国安捷伦公司, 型号: 110 系列); 紫外分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司, 型号: UV1102); 荧光分光光度计 (日本 HITACHA 公司, 型号: F-7000); 酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司, 型号: Multiscan MK3); 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司, 型号: TCS SP5); 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter Life Sciences 公司, 型号: CytoFLEX LX); 730 nm 光纤激光器 (吉林省一博商贸有限公司, 型号: ADR-1805)。

1.3 细胞培养

人卵巢癌细胞系 OVCAR-8 购自广州博辉生物科技有限公司, 使用 RPMI 1640 培养基进行培养, 该培养基中添加了 10%胎牛血清、50 U/mL 青霉素及 50 U/mL 链霉素。细胞置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中常规培养。待细胞生长至 70%~80%融合度时, 采用胰蛋白酶消化并传代。

1.4 RAPA 纳米盘的制备

采用薄膜水化法制备负载 RAPA 的纳米盘。精确称取处方量的 POPC、胆固醇、DSPE-PEG2000、DLPC、PdPC(OBu)₈ 及 RAPA, 溶于适量乙醇或氯仿, 超声处理至完全溶解。随后经减压蒸发去除有机溶剂, 形成脂质薄膜, 并真空干燥过夜以降低残留氯仿。加入预热的 PBS 缓冲液, 水化 30 min。水化后在冰浴条件下使用超声破碎仪进行超声处理: 50 W 5 min, 100 W 2 min。最后经 0.22 μm 水系滤膜过滤, 即得负载 RAPA 的纳米盘。空白纳米盘与负载 Ce6 的纳米盘按同法制备, Ce6 用量与 RAPA 一样。

表 1 纳米盘配方

Tab.1 Composition of nanodiscs

Component	Molar ratio
POPC	30
CHOL	40

DSPE-PEG2 000	25
DLPC	5
PdPC(OBu) ₈ ^a	0.005 : 1 ^b
RAPA ^a	0.005 : 1 ^b

^a Drug-to-lipid molar ratio; ^b Indicates the molar ratio of drug to total lipids.

1.5 纳米盘的表征

取少量制得的纳米盘，用去离子水稀释 50 倍，使用马尔文激光粒度仪测定其粒径与 Zeta 电位。将纳米盘置于 4 °C 贮藏，分别于第 0、1、3、5、7 天考察其粒径和电位变化。另通过透射电子显微镜观察纳米盘的形貌与粒径。

1.6 RAPA 检测方法的建立

1.6.1 色谱条件

Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (4.6 × 150 mm, 5 μm); 流动相甲醇: 纯水 (84 : 16, V/V), 等度洗脱; 柱温 50 °C; 检测波长 278 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样量 20 μL。

1.6.2 溶液配制

对照品溶液: 精密称量适量 RAPA, 置于容量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容, 10 000 r/min 离心 10 min。取上清液, 经 0.45 μm 有机系滤膜过滤, 即得对照品溶液。供试品溶液: 精密吸取制备的 RAPA 纳米盘溶液 500 μL, 置于 5 mL 容量瓶中, 甲醇定容。超声 10 min 破乳, 再于 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.45 μm 有机系滤膜, 即得供试品溶液。空白纳米盘破乳溶液: 精密吸取制备的空白纳米盘溶液 500 μL, 置于 5 mL 容量瓶中, 甲醇定容。同法进行超声破乳、离心及过滤处理, 即得空白纳米盘破乳溶液。

1.6.3 专属性实验

取“1.6.2”项下对照品溶液、供试品溶液及空白纳米盘破乳溶液, 经 0.22 μm 有机系滤膜过滤, 取续滤液, 按“1.6.1”项下色谱条件进样分析。

1.6.4 线性关系考察

精密称取 RAPA 5.00 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 甲醇溶解并定容, 制得 100 μg/mL 储备液。精密吸取储备液并加入甲醇稀释制成浓度为 40、20、10、5、2、1、0.5、0.2 μg/mL 的系列溶液, 经 0.22 μm 有机系滤膜过滤, 取续滤液作为系列浓度的对照品溶液。按“1.6.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱峰面积 A, 以峰面积 A 对浓度 C 进行线性回归, 绘制标准曲线。

1.6.5 精密度实验

采用低、中、高三个浓度（0.5、2、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的对照品溶液进行精密度考察。日内精密度：于一日内对各浓度分别平行测定 3 次；日间精密度：连续 3 日，每日测定 1 次。

1.6.6 重复性实验

取同一批纳米盘溶液 50 μL ，共 6 份，按“1.6.2”项下方法制备供试品溶液，并按“1.6.1”项下色谱条件进样测定。

1.6.7 稳定性实验

取对照品溶液，于室温条件下分别于 0、6、12、18、24 h 进样测定，记录各时间点对照品溶液浓度，评估溶液稳定性。

1.6.8 加样回收率实验

精密吸取用于配制低、中、高三个浓度（0.5、2、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）对照品的储备液，分别置 5 mL 容量瓶中，每一浓度配制 3 份。各加入 50 μL 空白纳米盘溶液，甲醇定容，超声 10 min 破乳，10 000 r/min 离心 10 min。取上清液经 0.22 μm 有机系滤膜过滤后进样测定，计算加样回收率。

1.7 纳米盘溶液中单线态氧的检测

采用单线态氧（singlet oxygen, $^1\text{O}_2$ ）检测探针 1, 3-二苯基异苯并呋喃（1, 3-diphenylisobenzofuran, DPBF）评估纳米盘在近红外光照下的 $^1\text{O}_2$ 生成能力。将纳米盘溶液稀释至适宜浓度后，加入 100 μL DPBF 溶液（0.3 mg/mL ），使用荧光分光光度计在激发波长 403 nm、扫描速度 240 nm/min、电压 700 V、狭缝宽度 10 nm 及响应时间 0.1 s 的参数下，扫描并记录 425~630 nm 范围内的发射光谱作为光照前 $^1\text{O}_2$ 生成的对照。随后，以 730 nm 近红外光在 300 mW/cm^2 的辐照强度下照射溶液 1 min，立即于相同条件下扫描记录 425~630 nm 的荧光值。通过比较光照前后光谱变化，评估 $^1\text{O}_2$ 生成情况。

1.8 纳米盘光敏响应释放

采用反向透析法考察 RAPA 纳米盘的光敏释放特性。以 30 mL 20%乙醇溶液为释放介质，置于 50 mL 离心管中。取 200 μL 纳米盘置于 1.5 mL 离心管内，加入 1 mL 释放介质，经 730 nm 近红外光（300 mW/cm^2 ）照射 5 min 后，转移至透析袋内，两端扎紧后放入离心管中。将离心管置于 37 $^\circ\text{C}$ 摇床中进行振荡（180 r/min）。分别于 1、2、4、8、12 h 从透析袋内取样 200 μL ，用于药物含量测定及累积释放率计算，每次取样后补充等体积释放介质以维持体系体积恒定。以取样时间为横坐标，累计释放率为纵坐标，绘制释药曲线。

1.9 纳米盘对人卵巢癌 OVCAR-8 细胞的毒性

1.9.1 近红外光对细胞的毒性

将对数生长期的 OVCAR-8 细胞以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板，贴壁后采用 730 nm 激光光源对细胞进行照射。设定光辐照强度分别为 50、100、300、500、1 000 和 1 200 mW/cm^2 ，每个强度分别处理不同组别的细胞，照射时间均为 3 min。照射完成后，将 96 孔板置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中继续培养 24 h。随后，弃去培养基，每孔加入含 10% CCK-8 的 DMEM 培养基，于细胞培养箱中避光孵育 2 h。最后使用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔吸光度值。

1.9.2 纳米盘对细胞的毒性

将对数生长期的 OVCAR-8 细胞以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板，贴壁后将培养基更换为含不同浓度磷脂 (0.054、0.107、0.215、0.430、0.859、1.719、3.438、6.875 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的空白纳米盘或不同浓度 (0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) PdPC(OBu)₈ 纳米盘的培养基，继续培养 24 h。弃去含药培养基，PBS 洗涤 2 次，更换为无药培养基，采用 730 nm 激光 ($300 \text{ mW}/\text{cm}^2$) 照射 3 min。照射完成后，将 96 孔板置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中继续培养 24 h。随后，弃去培养基，每孔加入含 10% CCK-8 的 DMEM 培养基，于细胞培养箱中避光孵育 2 h。最后使用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔吸光度值。

1.10 纳米盘对 OVCAR-8 细胞的摄取

1.10.1 共聚焦激光显微镜定性观察细胞摄取

将对数生长期的 OVCAR-8 细胞以每皿 1×10^5 个的密度接种于 35 mm 共聚焦皿中。细胞贴壁后弃去培养基，分别更换为含游离 Ce6 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、Ce6 纳米盘 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 PBS 的培养基，继续培养 4 h。对光照组进行光照 (730 nm, $300 \text{ mW}/\text{cm}^2$, 3 min)，弃去培养基，PBS 洗涤 3 次，4%多聚甲醛 1 mL 固定 10 min，PBS 洗涤 3 次，1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 1 mL 避光染色 10 min，PBS 洗涤 3 次，加入 1 mL PBS，于共聚焦激光显微镜下观察。

1.10.2 纳米盘的细胞摄取机制

配制浓度为 5×10^5 个/mL 的 OVCAR-8 细胞悬液，每孔接种 2 mL 于 6 孔板中，置于细胞培养箱内培养 12 h 使细胞贴壁。抑制剂组分别加入 200 μL 不同抑制剂溶液，包括阿米洛利 (amiloride, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、非律平 (filipin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氯丙嗪 (chlorpromazine, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、渥曼青霉素 (wortmannin, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、金雀异黄酮 (genistein, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，对照组与 4°C 组加入等体积 PBS。细胞培养箱孵育 30 min 后，每孔加入 1 mL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ce6 纳米盘溶液。随后，抑制剂组与对照组置于细胞培养箱继续孵育 1 h， 4°C 组置于 4°C 环境中孵育 1 h。孵

育结束后弃掉培养基，PBS 洗涤 3 次，经胰酶消化后 1 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，加入 0.4 mL PBS 重悬，使用流式细胞仪进行检测。

1.11 纳米盘细胞内活性氧（reactive oxygen species, ROS）检测

配制浓度为 3×10^5 个/mL 的 OVCAR-8 细胞悬液，每孔接种 1 mL 于 24 孔板中，待细胞贴壁后弃去培养基，加入 200 μ L 含不同 PdPC(OBu)₈ 浓度纳米盘的培养基，继续孵育 6 h。弃去含药培养基，换为 PBS，光照组进行激光照射（730 nm，300 mW/cm²，3 min）。照射后弃去 PBS，加入 250 μ L DHE 溶液（1 \times ），于 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min，PBS 洗涤 3 次，置于荧光显微镜下观察细胞染色情况。

1.12 统计学处理

使用 Graphpad Prism 10.1.2 软件进行统计学分析和作图。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 Student's *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，随后使用 Dunnett's *t* 检验进行多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米盘的表征

马尔文激光粒度仪结果显示，纳米盘的粒径为 (63.66 ± 0.27) nm，Zeta 电位为 (-18.2 ± 2.4) mV，见图 1A、1B。在 4 $^{\circ}$ C 条件下储存 7 d 后，粒径与电位均未发生显著变化（图 1C、1D），表明其在低温环境中具有良好的稳定性。透射电子显微镜图像显示纳米盘呈类球状或短棒状形态，分散均匀（图 1E）。

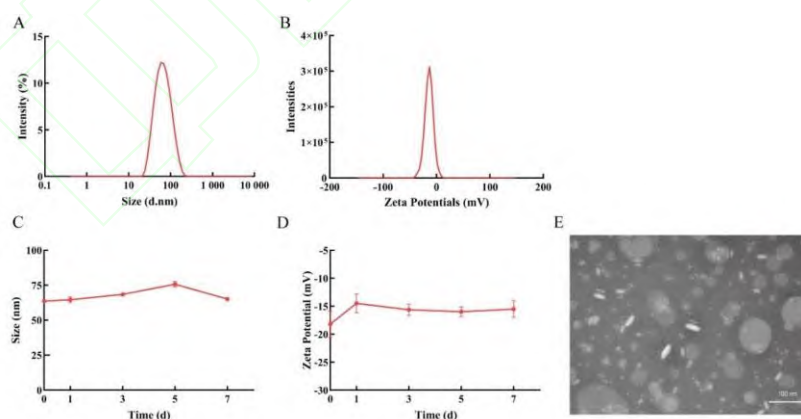


图 1 纳米盘的表征

Fig.1 Characterization of nanodiscs

A: Hydrodynamic size distribution of nanodiscs; B: Zeta potential distribution of nanodiscs; C: Size stability of nanodiscs over 7 days at 4 $^{\circ}$ C; D: Zeta potential stability of nanodiscs over 7 days at

4 °C; E. TEM image of nanodiscs ×100 000.

2.2 RAPA HPLC 方法学验证

2.2.1 专属性

在 HPLC 色谱条件下, 对照品溶液中 RAPA (图 2A) 出峰良好, 保留时间为 4.6 min, 不含 RAPA 的空白纳米盘溶液 (图 2C) 在 4.6 min 处无特异吸收峰, 供试品溶液 (图 2B) 在保留时间处出峰良好, 无干扰。表明该方法用于检测 RAPA 的专属性较强。

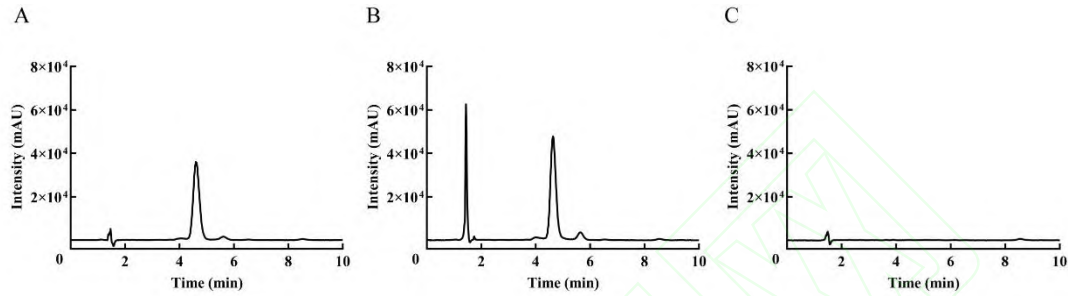


图 2 三种溶液的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of three solutions

A: Reference standard solution; B: Test sample solution; C: Demulsified blank photosensitive nanodisc solution.

2.2.2 线性关系

配制 40、20、10、5、2、1、0.5、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 的 RAPA 对照品溶液, 进行液相色谱分析。以对照品溶液浓度 C 为横坐标、色谱峰面积 A 为纵坐标绘制 RAPA 线性曲线图, 线性回归方程为 $A = 57\,062C - 2\,130$, $R^2 = 0.999\,9$ ($n = 5$)。结果表明该方法适用于 0.2 ~ 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 RAPA 的定量检测。

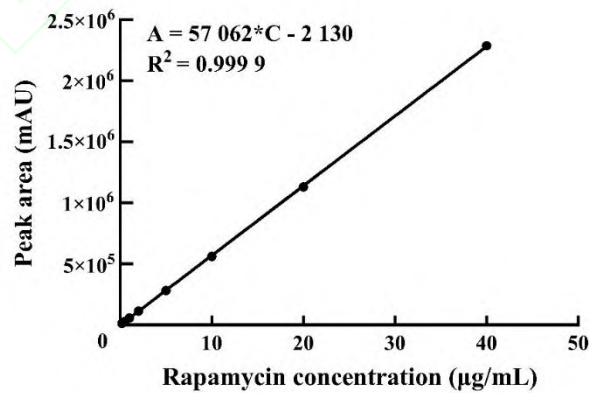


图 3 RAPA HPLC 分析的标准曲线

Fig.3 Calibration curve of RAPA by HPLC analysis

2.2.3 精密度

如表 2 所示, RAPA 在低、中、高 3 个浓度都具有较好的精密度, 日间精密度和日内精密度的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 均小于 5%, 表明该方法可用于含量测定。

表 2 RAPA HPLC 分析的精密度 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Precision of RAPA HPLC analysis ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Added ($\mu\text{g/mL}$)	Within-day		Between-day	
	Measure	RSD (%)	Measure	RSD (%)
0.5	0.52 ± 0.02	3.52	0.53 ± 0.01	1.76
2	2.04 ± 0.03	1.59	2.04 ± 0.03	1.47
10	9.80 ± 0.14	1.43	9.84 ± 0.08	0.85

2.2.4 重复性、稳定性和加样回收率

在 HPLC 色谱条件下, 供试品溶液中 RAPA 浓度为 (11.72 ± 0.15) $\mu\text{g/mL}$, RSD = 1.31% ($n = 6$), 表明本方法重复性良好。

在 24 h 内, 室温放置的对照品溶液中 RAPA 浓度由 2.07 $\mu\text{g/mL}$ 降至 2.04 $\mu\text{g/mL}$, 变化率为 -1.45% (RSD = 0.88%), 表明该溶液在此条件下稳定性良好。

采用加样回收的方法, 在已知含量的样品中添加空白纳米盘溶液, 色谱分析结果由表 3 可知, RAPA 在低、中、高 3 个浓度的回收率在 85%~115% 范围内, 且 RSD 值均小于 5%, 表明该提取方法稳定可靠。

表 3 RAPA HPLC 分析的加样回收率 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Recovery of RAPA by HPLC analysis ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Added ($\mu\text{g/mL}$)	Measured ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	RSD (%)
0.5	0.45 ± 0.02	89.7	3.50
2	1.83 ± 0.04	91.7	2.27
10	9.43 ± 0.09	94.3	0.90

2.3 纳米盘溶液中 $^1\text{O}_2$ 的检测

如图 4A 所示, DPBF 探针溶液在光照前的荧光强度约为 370, 经 730 nm 近红外光 (300 mW/cm^2) 照射 1 min 后, 其荧光强度迅速降至 10 左右。这一结果归因于纳米盘中的 PdPC(OBu)₈ 在近红外光激发下产生 $^1\text{O}_2$, 所产生的 $^1\text{O}_2$ 氧化并破坏了 DPBF 的分子结构^[13],

导致其荧光强度下降，由此证实了该纳米盘具有良好的 $^1\text{O}_2$ 生成能力。

2.4 纳米盘的光敏响应释放

采用反向透析法考察纳米盘在近红外光照射下的药物释放行为。在近红外光照射时，纳米盘中的 PdPC(OBu)₈ 可产生大量 $^1\text{O}_2$ 。产生的 $^1\text{O}_2$ 可氧化脂质膜中 DLPC 等不饱和磷脂的碳碳双键，引发脂质过氧化。这种氧化破坏会显著影响脂质膜的完整性和稳定性，从而促进包载药物的响应性释放。结果如图 4B 所示，非光照组 RAPA 释放缓慢；而光照组施加 730 nm 近红外光 (300 mW/cm^2) 照射 5 min 后，4 h、8 h、12 h 时 RAPA 的累计释放率均明显高于非光照组 ($t=15.49、93.66、60.28$ ，均 $P<0.001$)，表明该纳米盘具有良好的近红外光响应释药性能。

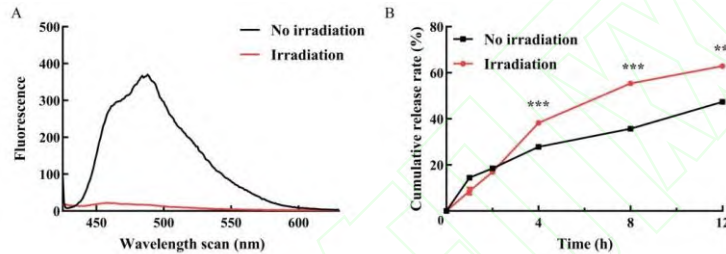


图 4 纳米盘的光敏响应释放

Fig.4 Photo-responsive release of nanodiscs

A: Near-infrared light-induced changes in DPBF fluorescence intensity; B: Cumulative release rate of RAPA from nanodiscs at different time points; *** $P<0.001$ vs No irradiation group.

2.5 纳米盘细胞内 ROS 检测

由图 5 可知，PBS 对照组在光照前后均未检测到明显红色荧光。在未光照时，纳米盘组的红色荧光强度随 PdPC(OBu)₈ 浓度升高而增强，提示其可产生一定量 ROS。近红外光照射后，即使在 PdPC(OBu)₈ 浓度为 $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时，纳米盘仍产生较多 ROS，荧光信号显著增强，且 ROS 生成量与 PdPC(OBu)₈ 浓度呈正相关。

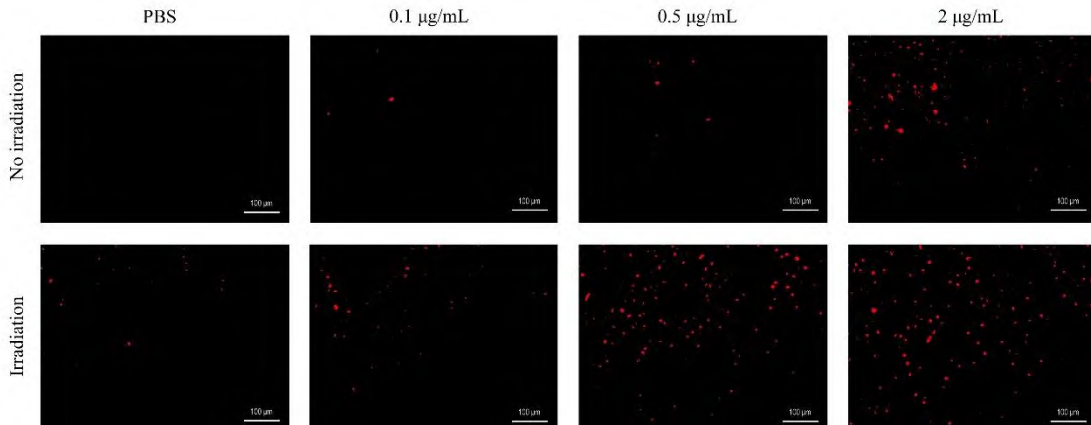


图 5 不同 PdPC(OBu)₈ 浓度纳米盘的 DHE 染色 (730 nm, 300 mW/cm², 3 min)

Fig.5 DHE staining of nanodiscs with different concentrations of PdPC(OBu)₈ (730 nm, 300 mW/cm², 3 min)

2.6 纳米盘对 OVCAR-8 细胞的毒性

采用不同光辐照强度的 730 nm 激光对 OVCAR-8 细胞进行照射, 每个辐照强度照射时间都为 3 min, 再通过 CCK-8 法检测不同光照强度对 OVCAR-8 细胞的毒性。结果发现即使光辐照强度达到 1 200 mW/cm², 细胞活力仍不低于 90% (图 6A), 表明以上光辐照强度对 OVCAR-8 细胞几乎没有毒性。未负载 PdPC(OBu)₈ 的纳米盘本身对 OVCAR-8 细胞无显著毒性 (图 6B); 负载 PdPC(OBu)₈ 后, 纳米盘未光照时其 IC₅₀ 为 32.15 μg/mL, 光照后其 IC₅₀ 小于 0.125 μg/mL (图 6C), 光照后其细胞毒性显著增强。该结果说明, 光照可通过激活光敏剂 PdPC(OBu)₈ 促进¹O₂生成, 从而显著增强其对肿瘤细胞的杀伤效果。

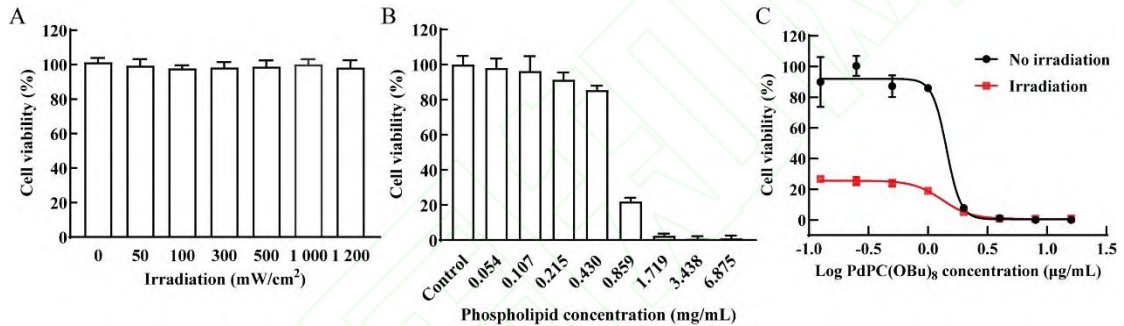


图 6 纳米盘的体外抗卵巢癌活性 ($n = 5$)

Fig.6 *In vitro* anti-ovarian cancer activity of nanodiscs ($n = 5$)

A: Cytotoxicity of near-infrared light at different irradiation intensities against OVCAR-8 cells; B: Cytotoxicity of nanodiscs with different phospholipid concentrations against OVCAR-8 cells; C: Cytotoxicity of nanodiscs with different concentrations of PdPC(OBu)₈ against OVCAR-8 cells with or without light irradiation.

2.7 共聚焦激光显微镜定性观察细胞摄取

如图 7 所示, 游离 Ce6 组的荧明显, Ce6 纳米盘组的荧光相对较弱, Ce6 纳米盘光照组光照后荧光显著增强, 但荧光仍弱于游离 Ce6 组。虽然纳米盘在光照前已经完成了细胞摄取过程, 但 Ce6 纳米盘光照组荧光强于 Ce6 纳米盘组, 可能是纳米盘光照后释放出 Ce6, 从而使荧光增强。

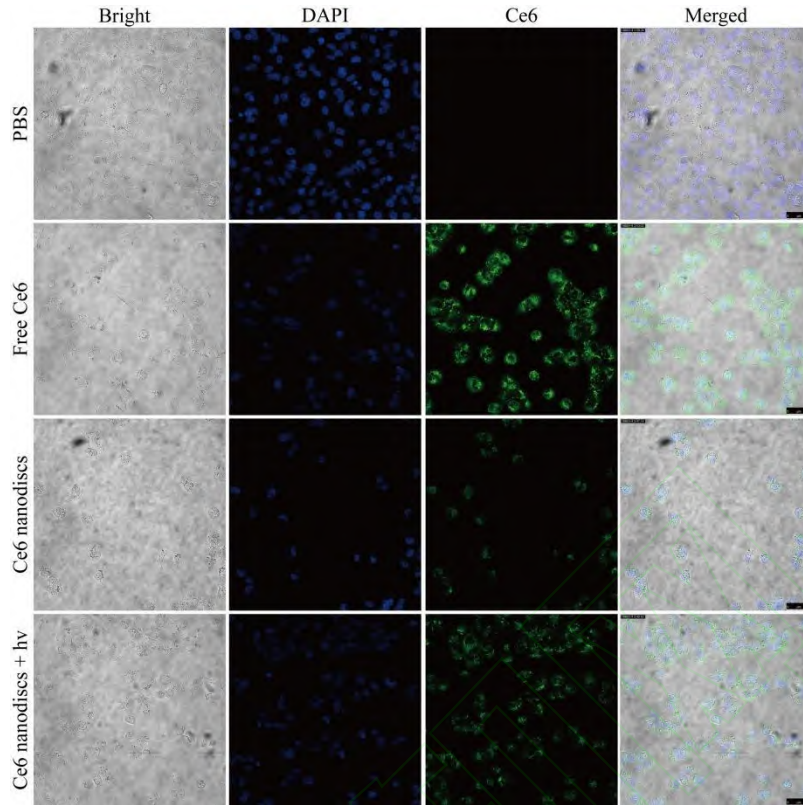


图 7 纳米盘的细胞摄取 (730 nm, 300 mW/cm², 3 min)

Fig.7 Cellular uptake of nanodiscs (730 nm, 300 mW/cm², 3 min)

2.8 纳米盘的细胞摄取机制

阿米洛利、非律平、氯丙嗪、渥曼青霉素与金雀异黄酮分别作为胞饮、小窝蛋白介导内吞、网格蛋白介导内吞、胞饮/网格蛋白以及网格蛋白/小窝蛋白内吞途径的抑制剂。如图 8 所示, 阿米洛利与非律平抑制剂组的 Ce6 相对摄取量未见显著变化, 表明纳米盘进入细胞不依赖于胞饮与小窝蛋白介导的内吞途径。氯丙嗪、渥曼青霉素与金雀异黄酮抑制剂组的 Ce6 相对摄取量分别为 (84.2±0.6) %、(78.9±1.3) %和 (70.8±1.9) %, 较对照组均降低 ($P=0.0006$, $P=0.0003$, $P=0.0001$), 说明上述抑制剂通过干扰网格蛋白途径有效抑制了纳米盘在 OVCAR-8 细胞中的摄取。此外, 4 °C 低温条件下的 Ce6 相对摄取量降至 (62.0±1.3) % ($P<0.0001$), 提示该过程为能量依赖性。综上所述, 纳米盘主要通过网格蛋白介导的能量依赖型内吞途径进入细胞。

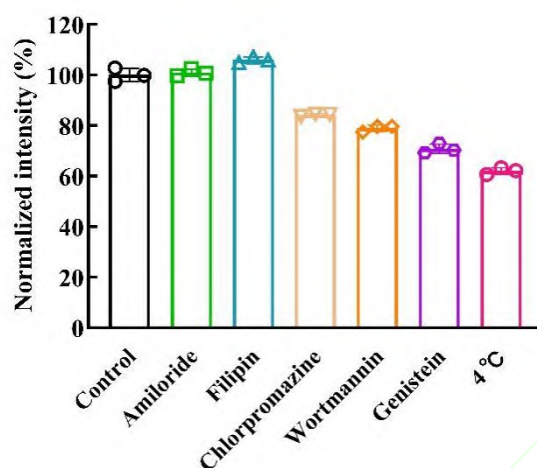


图 8 纳米盘的内吞抑制率

Fig.8 Endocytosis inhibition rate of nanodiscs

*** $P < 0.001$ vs Control group.

3 讨论

近年来,光响应纳米材料因其优异的光控特性与高时空精度调控能力,在肿瘤治疗领域备受关注^[10-12]。该类材料能够在特定波长光照下发生物理或化学变化,实现药物的定向释放、基因的高效递送或免疫微环境的局部调控^[13]。脂质纳米盘兼具生物相容性佳、小尺寸易穿透肿瘤基质的优势,与光响应技术结合为优化肿瘤药物递送提供了新策略^[14]。本研究旨在构建一种新型光敏纳米盘,用于实现 RAPA 的精准释放,并初步探究其体外抗卵巢癌效果。

本研究采用薄膜水化法成功构建了光敏纳米盘,所得制剂粒径均一,Zeta 电位适宜,且表现出良好的稳定性。建立的 HPLC 分析方法各项验证指标均符合要求,可有效实现 RAPA 的含量测定和释药行为分析。DHE 实验结果也验证了其可在光照后产生大量 $^1\text{O}_2$ 并具有浓度依赖性。此外,该纳米盘本身无显著细胞毒性,仅在光照后表现出浓度依赖性抗肿瘤效果,兼具良好的安全性与光控特异性。进一步的机制研究表明,该光敏纳米盘主要通过网格蛋白介导的能量依赖型内吞途径进入 OVCAR-8 细胞,保证了高效的细胞内化效率,光照后可实现胞内精准释药,解决了传统纳米载体胞内释药效率低的问题。

该制剂的核心创新在于将脂质纳米盘的结构优势与光响应特性结合,相较于传统光控纳米载体,其小尺寸与独特的盘状结构更易穿透肿瘤致密基质,实现药物向肿瘤深部递送;而光敏修饰赋予其近红外光触发的释药特性,能够在肿瘤局部实现 RAPA 的时空精准释放。同时, PdPC(OBu)₈ 介导的光动力效应与药物释放形成协同作用,光照后既通过 $^1\text{O}_2$ 氧化脂质膜触发释药,又在细胞内诱导 ROS 大量生成杀伤肿瘤细胞。但本研究仅完成体外实验,未开

展体内相关评价,也未探究 RAPA 对 On-switch CAR-T 系统的调控作用。后续将重点开展体内实验,考察制剂在动物模型中的抗肿瘤效果与生物安全性;RAPA 调控 On-switch CAR-T 系统的免疫联合治疗研究,也将作为后续核心方向深入开展。

综上所述,本研究成功制备了雷帕霉素光敏纳米盘,该制剂理化性质稳定、光控释药特性显著,且在体外展现出良好的抗卵巢癌活性与生物安全性,为实现抗肿瘤药物的时空精准递送提供了新型纳米制剂策略,也为脂质纳米盘在光响应载药系统中的研发与应用提供了实验依据。

参考文献

- [1] Tan X, Wang J, Chen S, et al. Novel CD19 Fast-CAR-T cells vs. CD19 conventional CAR-T cells for the treatment of relapsed/refractory CD19-positive B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Chin Med J*, 2025, 138(19): 2491-7. doi:10.1097/cm9.0000000000003479.
- [2] Neelapu S S, Tummala S, Kebriaei P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy—assessment and management of toxicities[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(1): 47-62. doi:10.1038/nrclinonc.2017.148.
- [3] Zhu Y, Liu K, Rosen S T, et al. Treatment-related adverse events of chimeric antigen receptor-T therapies for cancers in clinical trials: a systematic review and meta-analysis[J]. *eClinicalMedicine*, 2025, 84: 103267. doi:10.1016/j.eclinm.2025.103267.
- [4] 宋羽佳, 汪晨, 王恩秀, 等. 基于多链结构的 CD30 CAR-T 细胞的抗肿瘤作用研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(4): 666-70. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.017.
Song Y J, Wang C, Wang E X, et al. Study on the anti-tumor effect of CD30 CAR-T cells based on multi-chain structure[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(4): 666-70. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.017.
- [5] Wu C Y, Roybal K T, Puchner E M, et al. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor[J]. *Science*, 2015, 350(6258): aab4077. doi:10.1126/science.aab4077.
- [6] Appelbaum J, Price A E, Oda K, et al. Drug-regulated CD33-targeted CAR T cells control AML using clinically optimized rapamycin dosing[J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(9): e162593. doi:10.1172/jci162593.
- [7] Sahillioglu A C, Schumacher T N. Safety switches for adoptive cell therapy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2022, 74: 190-8. doi:10.1016/j.coi.2021.07.002.
- [8] Bariwal J, Ma H, Altenberg G A, et al. Nanodiscs: a versatile nanocarrier platform for cancer

diagnosis and treatment[J]. *Chem Soc Rev*, 2022, 51(5): 1702-28.

- [9] Dane E L, Belessiotis-Richards A, Backlund C, et al. STING agonist delivery by tumour-penetrating PEG-lipid nanodiscs primes robust anticancer immunity[J]. *Nat Mater*, 2022, 21(6): 710-20. doi:10.1038/s41563-022-01251-z.
- [10] Cheng Y, Zhou K, Chen Y, et al. Concurrent ferroptosis and pyroptosis induced by a dual-organelle-targeted type I/II AIE photosensitizer for bladder cancer immunotherapy[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2025, 64(46): e202509783. doi:10.1002/anie.202509783.
- [11] Ding Q, Chen S, Hua S, et al. Photoactivated nanovaccines[J]. *Chem Soc Rev*, 2025, 54(21): 9807-48. doi:10.1039/d5cs00608b.
- [12] Miao G, Shang Z, Wang X, et al. Concurrent inhibition of tumor growth and metastasis by a lipidated nanophotosensitizer tracing and disabling tumor extracellular vesicles[J]. *Nat Cancer*, 2025, 6(8): 1438-57. doi:10.1038/s43018-025-00997-0.
- [13] Lissau J S, Khelfallah M, Madsen M. Near-infrared to visible photon upconversion by palladium(II) octabutoxyphthalocyanine and rubrene in the solid state[J]. *J Phys Chem C*, 2021, 125(46): 25643-50. doi:10.1021/acs.jpcc.1c06945.
- [14] Alhussan A, Ho L, Zhang Y, et al. Lipid-based nanoparticles external triggered release strategies in cancer nanomedicine[J]. *J Nanobiotechnol*, 2025, 23(1): 641. doi:10.1186/s12951-025-03704-4.