

吲哚氰绿和羽扇豆醇复合脂质体用于结肠癌细胞光-免疫协同灭活研究

秦奋, 张涵, 张澜, 姚翠萍*, 王斯佳**, 张镇西

西安交通大学生命科学与技术学院, 生物医学光子学与传感研究所, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 陕西 西安 710049

摘要 结肠癌已成为我国主要癌症发病种类之一, 传统的治疗方法难以抑制其转移和复发。免疫疗法虽然可以通过机体免疫系统清除肿瘤组织, 但肿瘤组织中的免疫抑制微环境, 往往会导致效果不及预期。光学疗法, 包括光热疗法(PTT)和光动力疗法(PDT), 不仅可以直接诱导肿瘤细胞凋亡和坏死, 还能改善肿瘤组织中的免疫抑制环境, 从而促进免疫细胞在肿瘤组织中的浸润和活性, 提高免疫治疗效果。笔者创新性地利用吲哚氰绿(ICG)介导的光学疗法和天然免疫活性分子羽扇豆醇(Lupeol)对自然杀伤(NK)细胞免疫活性的提升作用实现光-免疫协同激活作用和抗肿瘤效果, 通过纳米脂质体将 ICG 和羽扇豆醇整合得到 Lip-Lupeol & ICG, 并将其用于结肠癌细胞灭活研究。结果显示: Lip-Lupeol & ICG 在通过两次间隔激光照射后可实现 PTT 和 PDT 的两次治疗作用, 可将结肠癌细胞活性抑制至 43.4%; 与此同时, 包裹的羽扇豆醇释放后可与光学疗法协同激活 NK 细胞活性, 将结肠癌细胞活性进一步抑制至 16.7%, 为临床结肠癌治疗提供了一种新思路。

关键词 医用光学; 吲哚氰绿; 羽扇豆醇; 光动力疗法; 光热疗法; NK 细胞免疫疗法

中图分类号 R735.3

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL231300

1 引言

最近十几年, 随着深加工食品在我国居民摄入食品中的不断增加, 以结肠癌为主的消化道癌症逐渐成为我国发病率较高的重大疾病之一。传统手术和放疗辅助的标准治疗模式往往无法长期抑制结肠癌的复发和转移, 而且存在较强的副作用, 迫切需要新的治疗方法和策略^[1]。激光光学疗法, 包括光热疗法(PTT)和光动力疗法(PDT), 通过时空特异性光照来定向诱导肿瘤细胞和组织内产生局域高热或活性氧簇分子, 从而实现肿瘤的抑制或清除, 已被证明是一种有前途的癌症治疗方法^[2]。近年来, 近红外(NIR)激光介导的光学疗法因具有相对较高的组织光学穿透深度而逐渐成为肿瘤治疗的热点之一^[3-5], 特别是吲哚氰绿(ICG)介导的光学疗法。ICG 具有近 50 年的临床使用安全记录, 在近红外波段具有宽吸收, 并且具有光热-光动力双重响应, 因而受到广泛关注^[6]。ICG 这种光敏药物经光照后会产生活性氧(ROS)等物种, 这些活性氧物种不仅能高效地氧化生物分子, 而且能与不饱和脂肪酸、蛋白质、核酸等反应,

产生损伤效应, 最终导致肿瘤细胞死亡^[7-8]。然而, ICG 本身具有自聚集和自淬灭特点, 并且其小分子在体内循环时间短, 因而通常需要脂质体等载体来提高其分散稳定性同时帮助其在肿瘤组织中积聚, 以便实现较好的光学治疗响应效率。但与传统的光敏或光热药物相比, ICG 的光转换效率较低^[9-10], 因此其作为光学造影剂的效果远大于其作为光学治疗剂的效果^[11]。ICG 介导的 PTT 效应温度通常低于 50 °C, 同时, 其自聚集的特点使其在光照下的 ROS 产率受到限制。这种温和的 PTT/PDT 不仅不能完全使肿瘤细胞坏死或凋亡, 而且还会激活肿瘤细胞的热休克反应等抵抗机制, 大大降低了治疗效果^[12]。因此, 仅 ICG 介导的光学疗法不足以胜任癌症的治疗, 尤其是无法用于治疗中晚期实体瘤。

免疫治疗, 即通过激活或募集人体自身免疫系统清除肿瘤组织, 已经在临床晚期肿瘤治疗方面显示出巨大潜力^[13]。此外, 近期的研究表明, PDT 和 PTT 可以诱导肿瘤细胞的免疫原性细胞死亡(ICD), 从而可以进一步提高树突状细胞的成熟和免疫细胞的激活^[14]。因此, 光-免疫协同疗法, 即 PDT/PTT 与免疫

收稿日期: 2023-10-19; 修回日期: 2023-11-26; 录用日期: 2023-12-11; 网络首发日期: 2023-12-12

基金项目: 国家自然科学基金(62275212)、广东省生物医学光学影像技术重点实验室开放基金(2020B121201010-3)、中德科学中心中德合作交流项目(Mobility Programme M-0063)

通信作者: *zsyxp@xjtu.edu.cn; **wang_sijia@xjtu.edu.cn

疗法结合,应运而生。近年来,许多研究评估了基于 ICG 的光-免疫协同抗肿瘤作用^[15]。例如:谢晓燕课题组^[16]首次将脂质体 ICG 介导的 PTT 与 PD-1、TIM-3 免疫检查点抑制剂相结合,实现了对原发性肿瘤的清除以及对远处肿瘤的抑制;Jin 课题组^[17]用含聚胞苷酸的热响应脂质体将 ICG 和水溶性免疫刺激分子聚肌苷酸同时包裹(含聚胞苷酸的热响应脂质体用于光热-免疫协同治疗),同样实现了对癌症生长和转移的抑制,同时提高了 T 细胞抗肿瘤免疫效果。除了免疫检查点抑制剂和免疫佐剂外,天然可食用物中的活性成分因具有对恶性肿瘤的显著抑制作用、较好的免疫促进作用和对人体相对较低的毒性也被逐渐用于光-免疫协同治疗的研究中^[18-19]。羽扇豆醇是一种广泛存在于水果、蔬菜皮、叶和茎皮中的天然五环三萜类化合物,已被证明具有较强的抗氧化、抗突变、抗炎效果^[20-21]。大量证据证明羽扇豆醇可以通过细胞信号通路途径诱导肿瘤细胞凋亡^[22],并可以通过激活 Ras、Fas 和 ERK 等信号通路抑制肿瘤生长并促进自然杀伤(NK)细胞等免疫细胞的增殖和活性^[23]。

基于此,笔者利用天然抗癌活性分子羽扇豆醇来提升 NK 细胞等免疫细胞的活性,将其与 ICG 介导的光学治疗结合,开发了基于纳米脂质体载药系统的 NK 细胞增强免疫疗法与 PTT、PDT 联合治疗的策略,以协同增强对结肠癌细胞的抑制效果。笔者以纳米脂质体为载体,将 ICG 和羽扇豆醇共同包封,制备了粒径均一、具有良好稳定性的纳米脂质体药物 Lip-Lupeol & ICG。在 808 nm 激光两次间隔照射下,ICG 介导的光热和光动力不仅可以诱导结肠癌细胞凋亡并引发免疫反应,还能释放包封的羽扇豆醇,从而激活 NK 细胞活性实现光-免疫协同抑癌作用,为结肠癌治疗提供了一种新思路。

2 实验材料与方法

2.1 结肠癌细胞和 NK 细胞的培养

将冻存的结肠癌细胞从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中,不停地摇动直至冻存液融化。配制含 12.5% FBS、 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素与 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 F-12K 完全培养基。冻存液融化后进行细胞离心,弃去冻存液,加入 1 mL 完全培养基,将细胞移至培养皿中,再加入完全培养基补足至 10 mL ;将培养皿置于 5% CO_2 细胞培养箱中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h ,换液时将原培养基弃去,再加入 2 mL PBS 溶液轻微摇晃润洗后弃去上清液。

将冻存的 NK 细胞从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中,不停地摇动直至冻存液融化。配制含 $0.2\text{ mmol}/\text{L}$ 肌醇、 $0.1\text{ mmol}/\text{L}$ β -巯基乙醇、 $0.02\text{ mmol}/\text{L}$ 叶酸、 12.5% 马血清和 12.5% FBS 的 MEM α 完全培养基。冻存液融化后进行细胞离心,弃

去冻存液,加入 1 mL 完全培养基,将细胞移至细胞培养瓶中,再加入完全培养基补足至 6 mL ;将培养瓶置于 5% CO_2 细胞培养箱中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h 。

2.2 不同浓度羽扇豆醇对结肠癌细胞和 NK 细胞活性的影响评估

将对数生长期的结肠癌细胞均匀铺于 96 孔板中,每孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液,每孔中的细胞数量为 1×10^4 个。将 96 孔板置于 5% CO_2 细胞培养箱中并于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,弃去孔板中的原培养基,向每孔中分别加入含有不同浓度羽扇豆醇的完全培养基溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$,继续培养 24 h ,保留原培养基,向每孔中分别加入 CCK-8 溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$ 后继续培养。根据试剂说明书采用酶标仪检测结肠癌细胞在 450 nm 下的吸光度。NK 细胞的培养同上述步骤。

2.3 羽扇豆醇对 NK 细胞 IFN- γ 表达的影响

将对数生长期的 NK 细胞均匀铺于 24 孔板中,每孔中的细胞数量为 1×10^5 个,培养 15 h 。弃去孔板中的原培养基,向每孔中分别加入含有不同浓度羽扇豆醇的完全培养基混合溶液 $500\text{ }\mu\text{L}$,继续培养 24 h 。对处理后的 NK 细胞进行离心,吸取上清液,将其加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 待测样品中,再与相对应的 IFN- γ Elisa 试剂盒溶液混合, 15 min 后检测 450 nm 波长下每孔的光密度(OD)值。

2.4 羽扇豆醇对结肠癌细胞表面 NKG2D 受体表达的影响

用 Western Blot 检测羽扇豆醇对结肠癌细胞表面 NKG2D 受体(包括 MICA、ULBP-2 蛋白)表达的影响。首先将对数生长期的结肠癌细胞均匀铺于 6 孔板中过夜,然后加入不同浓度的羽扇豆醇进行处理;将细胞原有培养基弃去,加入 PBS 缓冲液清洗两次,接着加入细胞裂解液 $200\text{ }\mu\text{L}$,静置 10 min ,再用细胞刮刀刮取细胞,收集细胞蛋白样本至离心管内,进行离心。取上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量;将调平后的 $20\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白样品加在丙烯酰胺凝胶中进行电泳,然后将样品转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上;室温下,将 PVDF 膜放入 5% 封闭液中孵育 70 min ,接着将 PVDF 膜与兔抗人单克隆抗体 MICA、ULBP-2 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床上过夜, β -actin 作为内参蛋白;用 TBST 洗 PVDF 膜 $3\sim 5$ 次,每次 8 min ,接着将 PVDF 膜与二抗孵育 70 min ,再用 TBST 洗膜(与上述步骤相同)。最后将膜与化学发光试剂盒的底物孵育,显影发光,用 ImageJ 计算灰度值。

2.5 羽扇豆醇对 NK 细胞介导的抗肿瘤活性的影响

将对数生长期的 NK 细胞均匀铺于 24 孔板中,每孔中的细胞数量为 1×10^5 个。培养 15 h 后,弃去孔板中的原培养基,向每孔中分别加入含有不同浓度羽扇豆醇的培养基溶液 $500\text{ }\mu\text{L}$,继续培养 24 h ;然后使用乳酸脱氢酶(LDH)释放测定法测定 NK 细胞介导的细胞毒性,用完全培养基将收集的结肠癌细胞密度调至

$1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 。同样计数 NK 细胞,并根据制定的效靶比(4:1)调节 NK 细胞的密度。将结肠癌细胞和 NK 细胞各 $100 \mu\text{L}$ 加入 96 孔板中并混合均匀,同时设置结肠癌细胞最大释放组(加入 LDH 释放试剂)和结肠癌细胞自然释放对照组。孵育 4 h 后用多孔板离心机以 2000 r/min 的速度离心 5 min,取 $100 \mu\text{L}$ 上清液并将其转移到新的 96 孔板中。使用 LDH 细胞毒性检测试剂盒根据说明书检测上清液中释放的 LDH。

2.6 羽扇豆醇脂质体(Lip-Lupeol)、ICG 脂质体(Lip-ICG)和复合脂质体(Lip-Lupeol&ICG)的合成

使用薄膜分散和物理挤出法制备纳米脂质体:

1) 按 1:1:2.5:5 的质量比(总质量为 16.5 mg)称取 DPPC、DOTAP、DSPE-PEG2000、胆固醇并用氯仿溶解,羽扇豆醇用丙酮溶解($40 \mu\text{g/mL}$);2) 向玻璃试管中加入 $400 \mu\text{L}$ DPPC、 $200 \mu\text{L}$ DOTAP、 $200 \mu\text{L}$ DSPE-PEG2000、 $50 \mu\text{L}$ 胆固醇和 $40 \mu\text{L}$ 羽扇豆醇溶液(ICG 脂质体中不加入),用涡旋振荡器缓慢但充分振荡或者用移液枪吹打混匀,然后用氮气吹干并使其在试管壁上形成一层均匀的脂质体薄膜,真空干燥 10 h;3) 加入 $400 \mu\text{L}$ $1000 \mu\text{g/mL}$ ICG 水溶液(羽扇豆醇脂质体不加入),在 49°C 水浴锅中水浴 20 min,随后用孔径为 100 nm 的聚碳酸酯膜和小型脂质体挤压系统进行多次挤压,获得粒径均一的 ICG 脂质体、羽扇豆醇脂质体以及同时包封 ICG 和羽扇豆醇的脂质体;4) 使用凝胶色谱柱除去游离的药物,重新收集脂质体。

采用低温透射电子显微镜(Cryo-TEM)对脂质体的形态进行表征,使用动态光散射仪(DLS)对脂质体的粒径和 Zeta 电位分别进行测量。脂质体中 ICG 的包封率通过 ICG 的荧光强度进行评估,羽扇豆醇的包封率间接通过上清液中羽扇豆醇的残留量进行评估。

2.7 体外光热表征及光热响应的药物释放

ICG 介导的光热效应导致的局部升温会使脂质体破裂,故而用 808 nm 激光分别照射 F-12K 完全培养基、空白脂质体(Blank)、Lip-Lupeol、Lip-ICG,照射时间分别为 2、4、6、8、10、12、14、16 min,测量其在各时间点的温度变化。准备 96 孔板,4 个孔为一组,从左到右从上到下分别是 Lip-ICG、Lip-Lupeol、Blank、PBS,用红外热像仪分别在 0、10、20 min 时拍摄红外热成像照片。观察 ICG 介导的 PTT 能否达到脂质体的相转变温度从而破裂释放药物。另外,为了评估 Lip-Lupeol & ICG 的体外响应特性,采用透析法分析 PTT 触发的脂质体 ICG 的释放效率。简而言之,将 3 mL Lip-Lupeol & ICG 溶液加入截留值为 100000 Da ($1 \text{ Da} = 1 \text{ u}$)的透析袋(Float-A-Lyser, Spectrum Labs)中,将透析袋置于含有 2 L PBS 的透析装置中,在 37°C 下持续透析 48 h。透析开始后 2 h,使用 808 nm 激光对溶液进行 20 min 的辐照(200 mW/cm^2)。在不同时间点取

样,使用荧光光谱仪测量不同时间点透析袋中残留的 ICG 的浓度。

2.8 结肠癌细胞对 Lip-Lupeol & ICG 的内吞作用

将结肠癌细胞以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种在 24 孔板中,加入 Lip-Lupeol & ICG 共同孵育,然后分别在不同的时间点(2 h、4 h 和 6 h)收集细胞进行荧光光谱分析(激发波长 $E_x = 808 \text{ nm}$,发射波长 $E_m = 810 \text{ nm}$)。采用共聚焦显微镜表征 Lip-Lupeol & ICG 在细胞中的分布:先将结肠癌细胞接种在共聚焦培养皿中,贴壁后再加入 Lip-Lupeol & ICG 孵育 4 h;然后加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,再用 PBS 洗涤细胞,然后用 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)染色 5 min;最后采用共聚焦显微镜观察细胞并拍照。用流式细胞仪测量荧光强度,测量前,将结肠癌细胞以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种,第二天加入 Lip-Lupeol & ICG 分别孵育 2、4、6 h,收集细胞,避光处理。

2.9 Lip-Lupeol & ICG 复合脂质体光照后 ROS 的产生

Lip-Lupeol & ICG 复合脂质体光照后,由于 ICG 的光动力作用会产生活性氧簇分子 ROS,因而可以诱导结肠癌细胞凋亡。使用活性氧荧光探针 DCFH-DA 检测结肠癌细胞中 ROS 是否产生。将 1×10^5 个结肠癌细胞接种到共聚焦专用培养皿中,分别与 $1 \mu\text{g/mL}$ Lip-ICG(含有 $1 \mu\text{g/mL}$ ICG)共同孵育 4 h,未经处理的细胞作为阴性对照组。用 PBS 洗涤细胞,加入无血清培养基稀释的 DCFH-DA 探针(终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$),继续培养 20 min, PBS 洗涤细胞后用 808 nm 激光辐照(200 mW/cm^2)5 min。采用荧光显微镜(在 FITC 通道下)观察荧光图像($E_x/E_m = 495 \text{ nm}/520 \text{ nm}$)并用荧光显微镜拍照。

2.10 Lip-Lupeol & ICG 复合脂质体对结肠癌细胞活性抑制效果的评估

使用 CCK-8 法评估 Lip-Lupeol & ICG 复合脂质体对结肠癌细胞活性的抑制效果。将结肠癌细胞接种在 96 孔板中,并用含不同浓度 Lip-Lupeol、Lip-ICG、Lip-Lupeol & ICG 以及 Blank 的 F-12K 完全培养基(体积比 1:1,即 $50 \mu\text{L}$ 脂质体 + $50 \mu\text{L}$ 完全培养基)共孵育 4 h。将细胞分为 4 组:1) 用 808 nm 激光辐照 20 min (200 mW/cm^2);2) 先辐照 20 min (200 mW/cm^2),间隔 20 min 后再辐照 10 min (200 mW/cm^2),继续培养 24 h;3) 加入 NK 细胞,先辐照 20 min (200 mW/cm^2),间隔 20 min 后再辐照 10 min (200 mW/cm^2);4) 不辐照,培养 24 h。各孔加入 1% CCK-8 孵育 2 h 后测量 450 nm 下的吸光度值,计算细胞存活率。

2.11 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9 对实验结果进行统计分析,结果表示为平均值 ± 标准偏差(SD)。使用单因素方差分析进行多组之间的比较。统计显著性定义为 $P < 0.05$ (*)、 $P < 0.01$ (**)和 $P < 0.001$ (***)。

3 实验结果与讨论

3.1 羽扇豆醇对肿瘤细胞和 NK 细胞活性的影响

大量的研究已证明羽扇豆醇可显著抑制肿瘤细胞的活性,为了后续研究其与 ICG 介导光学疗法的协同效果,需要首先阐明羽扇豆醇对肿瘤细胞和 NK 细胞

活性的影响。图 1(a)显示了不同质量浓度的羽扇豆醇对结肠癌细胞活性(采用 CCK-8 法检测结肠癌细胞的活性)的影响。随着质量浓度增大,羽扇豆醇对细胞的杀伤能力逐渐增强:20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 羽扇豆醇可使结肠癌细胞活力出现轻微下降(91.12%),当其质量浓度达到 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,结肠癌细胞活性降低至 72.2%,继续增

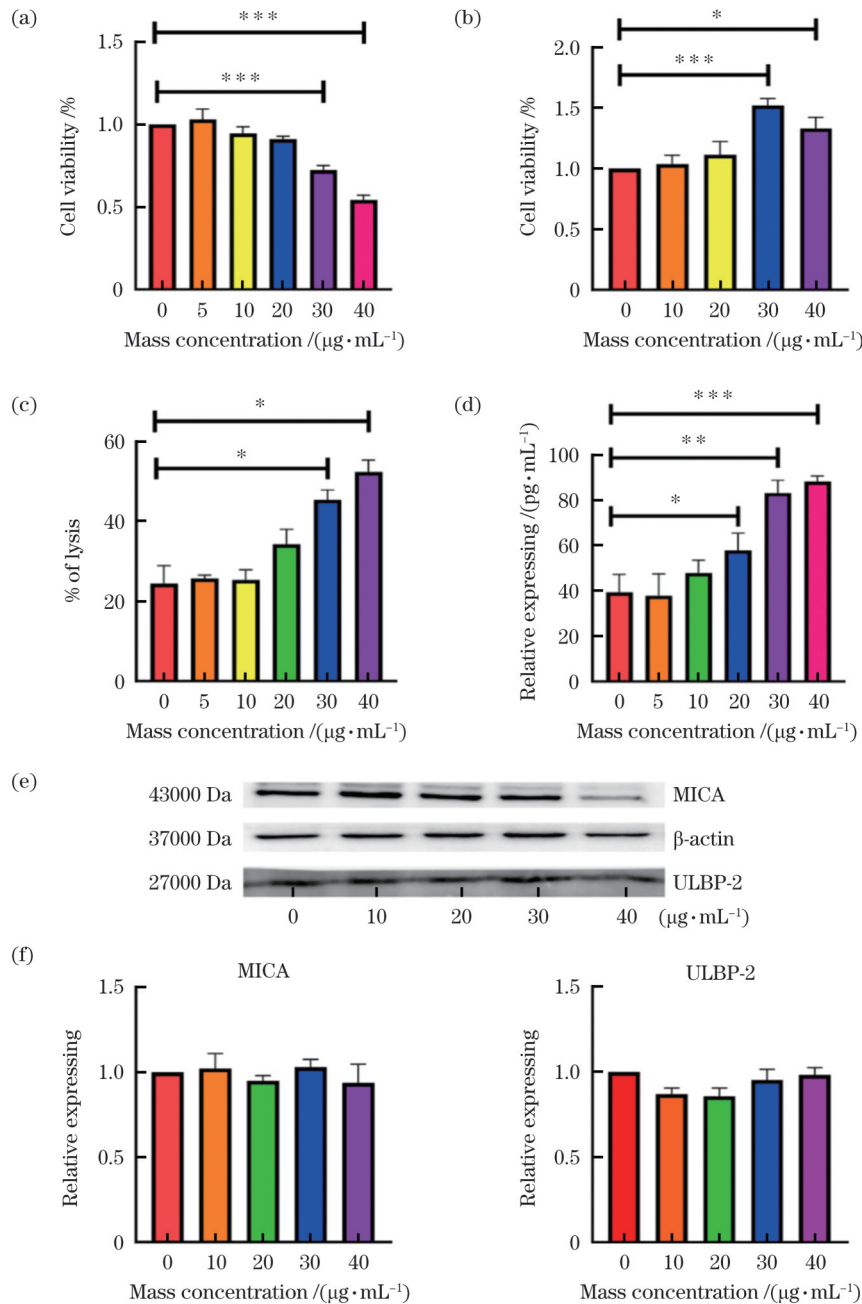


图 1 羽扇豆醇对结肠癌细胞和 NK 细胞的影响。(a)不同质量浓度的羽扇豆醇对结肠癌细胞的毒性;(b)不同质量浓度的羽扇豆醇对 NK 细胞活性的影响;(c)经不同质量浓度的羽扇豆醇处理的 NK 细胞对结肠癌细胞的杀伤作用;(d)不同质量浓度的羽扇豆醇对 NK 细胞 IFN- γ 表达的影响;(e)(f)不同质量浓度的羽扇豆醇对结肠癌细胞表面 MICA、ULBP-2 表达的影响

Fig. 1 Effects of lupeol on colon cancer cells and NK cells. (a) Toxicity of different mass concentrations of lupeol on colon cancer cells; (b) effect of different mass concentrations of lupeol on NK cell activity; (c) killing effect of NK cells treated with different mass concentrations lupeol on colon cancer cells; (d) effect of different mass concentrations of lupeol on the expression of IFN- γ in NK cells;(e)(f) effect of different mass concentrations of lupeol on the expression of MICA and ULBP-2 on the surface of colon cancer cells

加羽扇豆醇质量浓度至 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,结肠癌细胞的活性降低至 54.3%。这一结果说明羽扇豆醇作为天然抗癌活性分子在达到一定质量浓度时能够显著抑制结肠癌细胞增殖。图 1(b) 显示了不同质量浓度的羽扇豆醇对 NK 细胞活性的影响,可见:当羽扇豆醇质量浓度小于 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,NK 细胞的活性相比对照组没有显著增加;当羽扇豆醇质量浓度增加至 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,NK 细胞的活性有了显著性提高;当羽扇豆醇的质量浓度增加至 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,NK 细胞的活性变低。可见,质量浓度在 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右的羽扇豆醇能够显著提升 NK 细胞的活性,验证了其免疫细胞活性的提升作用。

进一步评估了不同质量浓度羽扇豆醇处理后的 NK 细胞对结肠癌细胞的抑制效果,结果如图 1(c) 所示。NK 细胞是淋巴细胞中主要起免疫作用的细胞,可以通过 NKG2D 配体蛋白更容易地识别、杀伤结肠癌细胞,但通常情况下结肠癌组织可以通过抑制 NK 细胞的 IFN- γ 干扰素表达或水解表面的 NKG2D 配体蛋白,使 NK 细胞活性降低或不能识别肿瘤细胞。因此,未经羽扇豆醇处理的 NK 细胞仅能对结肠癌细胞造成 24.35% 的活性抑制,而采用 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 羽扇豆醇处理的 NK 细胞对结肠癌细胞的抑制效果可显著增加到 45.35%,并且随着羽扇豆醇质量浓度增加,NK 细胞对结肠癌细胞的抑制效果显著提升。当羽扇豆醇的质量浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其可对结肠癌细胞造成 52.25% 的活性抑制。可见,一定质量浓度的羽扇豆醇可以显著增加 NK 细胞的抗肿瘤免疫活性,这为后续研究其与 ICG 介导的光学协同疗法奠定了基础。

3.2 羽扇豆醇对 NK 细胞免疫作用提升机理的研究

在明确羽扇豆醇可以提升 NK 细胞活性和增强抗肿瘤效果以后,笔者进一步研究了其作用机理。羽扇豆醇对 NK 细胞活性的影响主要反映在 NK 细胞 IFN- γ 干扰素表达和肿瘤细胞表面 NKG2D 配体蛋白表达两方面。如图 1(d) 所示,对经不同质量浓度羽扇豆醇处理的 NK 细胞 IFN- γ 干扰素的表达进行分析可以发现:与未经处理的对照组相比,经 5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 羽扇豆醇处理的 NK 细胞的 IFN- γ 干扰素的质量浓度基本没有发生变化;但当羽扇豆醇质量浓度上升到 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,IFN- γ 干扰素质量浓度分别达到了 57.8 pg/mL 和 83.23 pg/mL 。可见,羽扇豆醇可以通过促进 NK 细胞 IFN- γ 的表达增强其活性和抗肿瘤作用。

此外,肿瘤细胞表面产生的 NKG2D 配体使 NK 细胞更容易识别之并对之进行杀伤,因此笔者还检测了不同质量浓度羽扇豆醇处理后的结肠癌细胞上 NKG2D 配体 (MICA 和 ULBP-2) 表达的变化。如图 1(e)、(f) 所示,随着羽扇豆醇质量浓度增大,培养 24 h 后,结肠癌细胞表面 MICA 和 ULBP-2 均有表达,但表达量没

有明显变化。这说明羽扇豆醇不能通过促进肿瘤细胞表面 NKG2D 配体的表达来增强 NK 细胞的抗肿瘤作用。

3.3 Lip-Lupeol、Lip-ICG、Lip-Lupeol & ICG 的表征

如图 2(a) 所示,使用冷冻透射电镜 Cryo-TEM 对所制备的脂质体结构和外观进行表征。所制备的脂质体 (Blank: 不包封任何药物; Lip-Lupeol: 只包封羽扇豆醇; Lip-ICG: 只包封 ICG; Lip-Lupeol & ICG: 共包封羽扇豆醇和 ICG) 呈球形,形态规则均一,有明显的磷脂双分子层结构,并且都呈现为单层或双层囊泡,有利于其中 ICG 和羽扇豆醇药物的包封和释放。此外,脂质体分散性良好,没有观察到聚集现象。

同时,使用马尔文粒度仪对所制备的脂质体的粒径和电位进行表征。如图 2(b) 所示,所制备脂质体的粒径大部分集中在 150 nm 左右处,且粒径分布范围较窄,聚合物分散性指数 (PDI) 约为 0.05,而且 ICG 和羽扇豆醇的封装不会对脂质体粒径产生较大影响。如图 2(c) 所示,4 种不同脂质体均带有一定的正电荷,可以更容易地被肿瘤细胞摄取。这一特点结合脂质体表面 PEG 支链的空间位阻效应,使得脂质体具有较好的稳定性。如图 2(d) 所示,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 14 d 后,所有脂质体的粒径都没有发生明显变化,PDI 也没有发生改变,说明所制备的脂质体可以保存较长时间,证实了其具有良好的分散性和稳定性。

进一步地,笔者测定了不同脂质体的紫外吸收光谱图,如图 2(e) 所示。可见,ICG 脂质体和复合脂质体在 600~800 nm 范围内都有较宽的吸收,而且在 800 nm 左右处的吸收最强。同时,根据不同质量浓度 ICG 溶液的吸收光谱,计算得到了 ICG 脂质体和复合脂质体中 ICG 的包封率分别为 46.01% 和 29.2%。图 2(f) 显示了羽扇豆醇脂质体和复合脂质体的高效液相色谱图,根据不同质量浓度羽扇豆醇的峰面积可以计算得到羽扇豆醇脂质体和复合脂质体中羽扇豆醇的包封率分别为 77.03% 和 42.1%。可见,制备得到的复合脂质体可以同时较好地负载一定质量浓度的 ICG 和羽扇豆醇,这为后期研究中药物剂量的定量提供了参考。

3.4 Lip-Lupeol & ICG 的光热性能表征及其诱导的药物释放

Lip-Lupeol & ICG 在 808 nm 激光照射下具备较好的光热性能,这是因为 ICG 聚集嵌入磷脂双层膜中。图 3(a) 表明,不包封 ICG 的脂质体不会因为激光照射而在短时间内剧烈升温,但是包封 ICG 的脂质体在 0~8 min 内快速升温,照射 8 min 时温度可升至 42.2 $^{\circ}\text{C}$,之后随着照射时间延长,温度趋于稳定。这是因为磷脂分子在高温下的相变特性使得温度升高后脂质体结构破裂。由图 3(b) 可见,ICG 的光热效应使磷脂双分子层脂质中的温度升高达到其临界相变温度

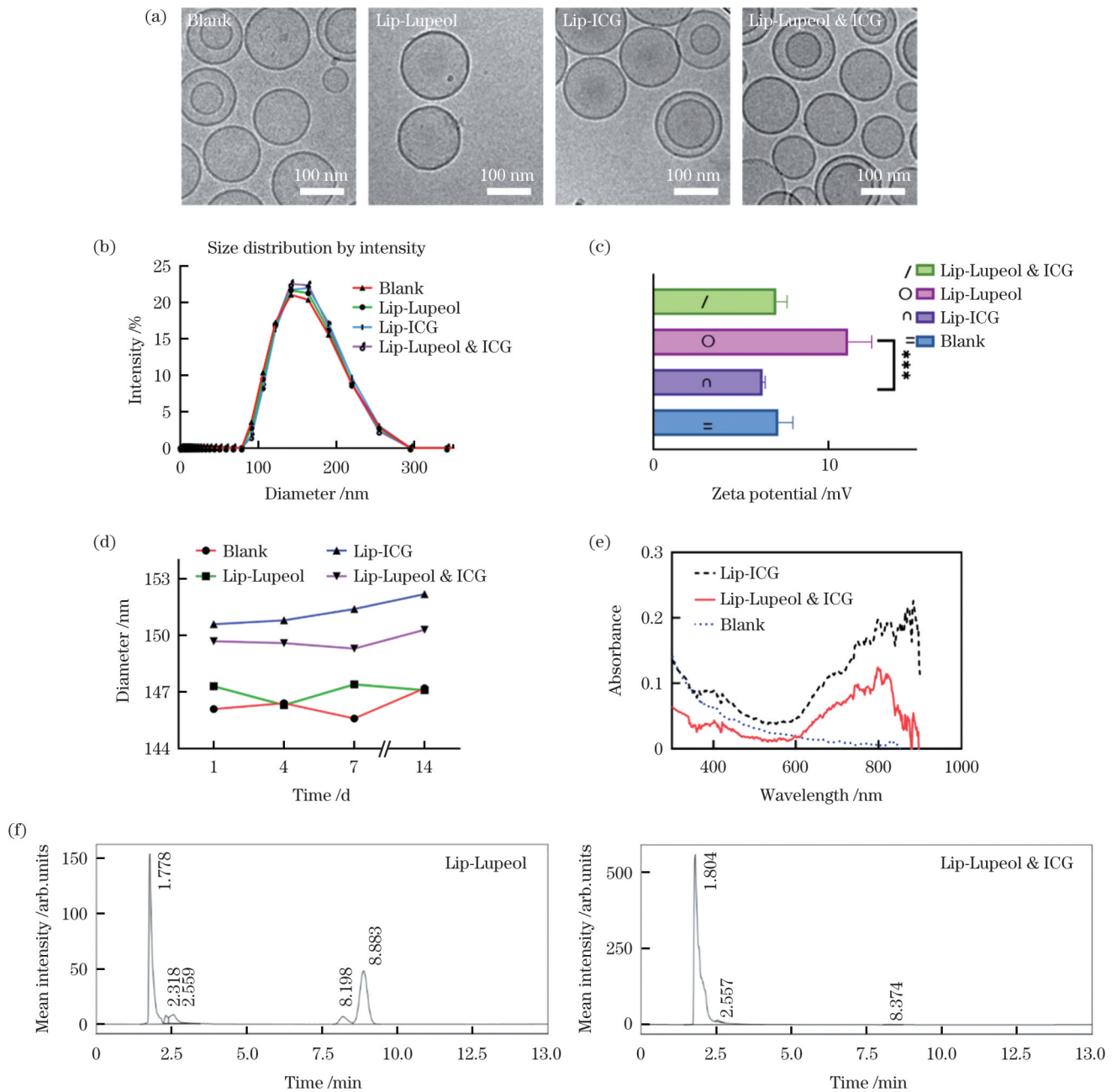


图2 ICG和羽扇豆醇脂质体及其复合脂质体的表征。(a)冷冻电镜表征结果;(b)粒径分布表征结果;(c)Zeta电位表征结果;(d)稳定性表征结果;(e)脂质体紫外吸收光谱图;(f)脂质体中羽扇豆醇的高效液相色谱图

Fig. 2 Characterization of ICG and lupeol liposomes and their composite liposomes. (a) Freezing electron microscopy characterization results; (b) characterization results of particle size distribution; (c) Zeta potential characterization results; (d) stability characterization results; (e) UV absorption spectra of liposomes; (f) high performance liquid chromatography of lupeol in liposomes

(42 °C), 脂质体结构破裂, 变成了外形大小不均一的形态, 从而达到了释放药物的目的。图 3(c) 显示的是不同脂质体以及 PBS 经 808 nm 激光 (200 mW/cm²) 照射后不同时间 (0、10、20 min) 时的红外热成像图, 左上角包封 ICG 的脂质体随着时间延长, 越来越亮, 表明其局部温度越来越高。图 3(d) 表明, 经 808 nm 激光照射的 Blank 和包封羽扇豆醇的脂质体释放缓慢, 包封羽扇豆醇的脂质体在透析 20 min 后大约只有 16.9% 的羽扇豆醇从脂质体中释放出来, 且在 0~20 min 内释

放率没有显著升高。然而, 当用激光刺激包封 ICG 的脂质体后, 前 10 min 内羽扇豆醇释放量没有较大变化, 但是在 10 min 时, 羽扇豆醇的释放量开始急剧增加, 并在 18 min 左右时达到 82.1%。这说明 Lip-Lupeol & ICG 中 ICG 的光热效应有助于实现时空特异的药物释放。

3.5 Lip-Lupeol & ICG 的结肠癌细胞内吞和细胞内 ROS 生成

为了确定细胞对 Lip-Lupeol & ICG 的摄取效率,

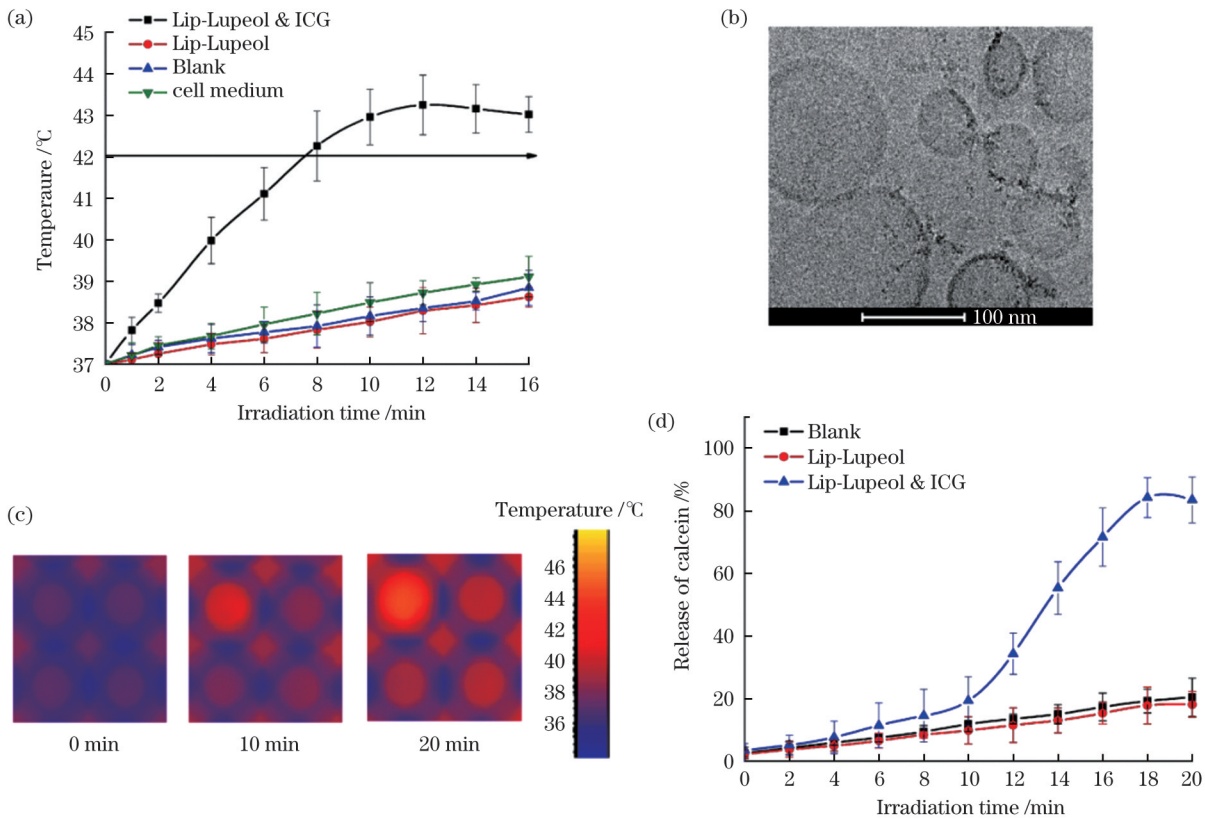


图3 Lip-Lupeol & ICG的光热性能表征以及光热诱导的药物释放。(a)不同脂质体在光照后的温度变化;(b)冷冻电镜显示光照后复合脂质体破裂;(c)不同脂质体在光照不同时间后的红外热成像图展示了温度变化;(d)光照后不同脂质体的ICG释放量

Fig. 3 Characterization of photothermal properties and photothermal induced drug release of Lip-Lupeol & ICG. (a) Temperature changes of different liposomes after light exposure; (b) freeze electron microscopy shows the rupture of the composite liposome after light exposure; (c) temperature changes shown by infrared thermal imaging images of different liposomes after different light exposure time; (d) ICG release of different liposomes after light exposure

使用荧光分光光度计法检测了结肠癌细胞与 Lip-Lupeol & ICG 共孵育 2、4、6 h 后细胞所含 ICG 的荧光强度。如图 4(a) 所示,共孵育 2 h 后,细胞内能够检测到 ICG 的荧光强度,并且在 2~4 h 内可检测到荧光强度显著升高,共孵育 4 h 后达到最大荧光强度。共孵育 6 h 后,荧光强度略微降低(与共孵育 4 h 相比),这可能是由于细胞对脂质体的摄取在 4 h 时达到平衡。图 4(b) 显示了孵育 4 h 后结肠癌细胞中 ICG 荧光的分布,图内蓝色是因为使用 Dapi 对细胞核进行了染色,红色代表 ICG 的分布。由于 ICG 具有两亲性,因此其主要分布在细胞膜上。图 4(c) 所示流式细胞的结果也表明结肠癌细胞与 ICG 脂质体、复合脂质体共孵育 4 h 后荧光强度达到最大。这些结果说明了结肠癌细胞能够有效摄取 Lip-Lupeol & ICG,并在共孵育 4 h 后达到内吞峰值。

Lip-Lupeol & ICG 在光照引发的光热作用下释放后,ICG 在细胞内扩散游离,再次进行光照可以有效诱导其进一步的 PDT 作用。为了验证这一点,笔者用 ROS 特异性探针 DCFH-DA 检测了不同光照情况下 Lip-Lupeol & ICG 在细胞内的 ROS 生成情况。图 4(d) 显示:经 808 nm 激光辐照后,未经处理和未经光照的

结肠癌细胞组生成的 ROS 极少,仅进行一次 20 min 光照处理后,结肠癌细胞中仅有少量的 ROS。这是因为在一次照射后,ICG 主要积聚在脂质体膜中,而团簇效应在光照下主要发挥光热效应,光动力效应较弱。经过两次间隔 20 min 光照的细胞中产生的 ROS 水平显著高于只进行一次光照的 ROS 水平,这是因为在第一次光照诱导的光热作用后,ICG 从脂质体中释放到细胞质中,在 20 min 间隔期间,释放的 ICG 主要处于游离状态,此时进行第二次光照能够更好地发挥其光动力效应,产生更多的 ROS。因此,利用 ICG 脂质体的这种两步间隔光照,还可以最大化协同结合光热和光动力的光学治疗效果。

3.6 Lip-Lupeol & ICG 对结肠癌细胞的抑制效果

图 4(e) 显示了纳米脂质体对结肠癌细胞的 PTT/PDT 以及光-免疫协同抑制效果。在没有激光照射的情况下,Blank 对结肠癌细胞无明显的细胞毒性,细胞活力基本上与对照组保持一致,说明 Blank 具有良好的生物相容性。在仅进行一次 20 min 光照组中,Blank 与 Lip-Lupeol 处理的细胞的活性没有明显变化,但由于 ICG 的光热作用,Lip-ICG 和 Lip-Lupeol & ICG 使得细胞活性分别下降至 64% 和

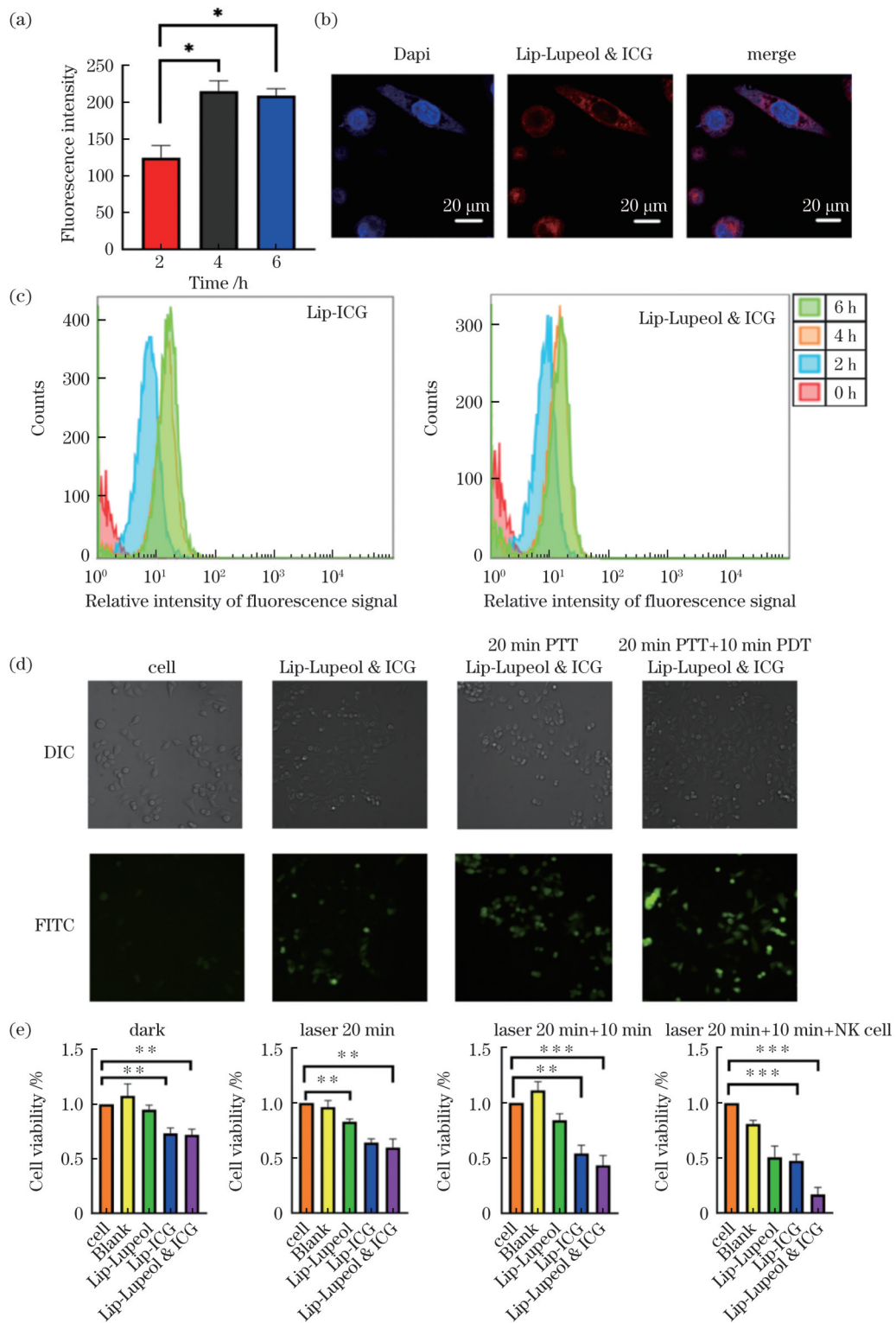


图 4 Lip-Lupeeol & ICG 对结肠癌细胞的作用效果。(a) 荧光分光光度计检测结肠癌细胞对 Lip-Lupeeol & ICG 的内吞作用；(b) 激光共聚焦显微镜显示内吞后 ICG 在结肠癌细胞内的分布；(c) 流式细胞仪检测结肠癌细胞对 Lip-Lupeeol & ICG 的内吞作用；(d) 不同光照模式下, Lip-Lupeeol & ICG 在结肠癌细胞内的 ROS 生成情况；(e) Lip-Lupeeol & ICG 对结肠癌细胞的光热-光动力抑制效果及其结合 NK 细胞对结肠癌细胞的光-免疫协同抑制效果

Fig. 4 Effect of Lip-Lupeeol & ICG on colon cancer cells. (a) Fluorescence spectrophotometer detection of the endocytosis of Lip-Lupeeol & ICG by colon cancer cells; (b) laser confocal microscopy shows the distribution of ICG in colon cancer cells after endocytosis; (c) flow cytometry detection of the endocytosis of Lip-Lupeeol & ICG by colon cancer cells; (d) ROS production of Lip-Lupeeol & ICG in colon cancer cells under different light modes; (e) Lip-Lupeeol & ICG's photothermal photodynamic inhibition effect on colon cancer cells and its photoimmune synergistic inhibition effect combined with NK cells on colon cancer cells

59.6%。由于复合脂质体 Lip-Lupeol & ICG 中羽扇豆醇的质量浓度不高,对结肠癌细胞的直接抑制作用有限,故而光热释放后 Lip-Lupeol & ICG 和 Lip-ICG 处理的细胞的活性抑制程度区别不大。但在两步间隔光照组中,由于进一步释放后 ICG 的光动力效应被激活, Lip-ICG 和 Lip-Lupeol & ICG 使得细胞活性分别进一步下降至 54.1% 和 43.4%。可见,两步间隔光照模式能够最大化发挥复合纳米脂质体的光学抑癌效果。为了明确复合脂质体中羽扇豆醇的协同作用,在两步间隔光照的基础上进一步加入了 NK 细胞的作用。可以看到,随着 NK 细胞的加入, Lip-Lupeol、Lip-ICG、Lip-Lupeol & ICG 处理的细胞的活性都显著低于仅进行光照组。同时,对比该组中 Lip-ICG 和 Lip-Lupeol & ICG 处理的细胞可以看到两者具有明显的活性差异,复合脂质体处理的细胞释放的羽扇豆醇显著增强了 NK 细胞的作用效果,最终能够将结肠癌细胞的活性抑制到 16.7%,从而证明了低剂量羽扇豆醇不会直接抑制肿瘤细胞活性,但能够协同 NK 细胞与 ICG 光学治疗达到明显增强的光-免疫协同作用效果。

综上所述,本研究证明了羽扇豆醇对 NK 细胞的免疫增强机制和效果,以及其通过复合纳米脂质体载体与 ICG 介导的 PTT/PDT 协同的光-免疫增强治疗作用。研究中采用的 ICG、羽扇豆醇天然分子和脂质体纳米载体,都容易进行临床转化,这些都有利于笔者所构建的羽扇豆醇和 ICG 复合纳米脂质体的进一步动物实验研究和临床实际转化,相信对其进行进一步研究可促进其在结肠癌治疗中的应用。

4 结 论

本文验证了羽扇豆醇天然分子对 NK 细胞活性提升的效果和作用机理。笔者设计合成了一种能同时包封 ICG 和羽扇豆醇的复合纳米脂质体 (Lip-Lupeol & ICG),实现了 ICG 诱导的近红外光热/光动力作用联合羽扇豆醇介导的 NK 细胞增强免疫疗法对结肠癌细胞的光-免疫协同抑制作用。研究结果表明,当采用 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的羽扇豆醇处理 NK 细胞后, NK 细胞无明显损伤,且分泌的 IFN- γ 由对照组的 38.97 pg/mL 上升到了 83.23 pg/mL ,对结肠癌细胞的抑制效果由 24.35% 显著提升到 45.35%。可见,适当质量浓度的羽扇豆醇可以显著增加 NK 细胞的抗肿瘤作用。进一步,将羽扇豆醇与 ICG 通过脂质体载体整合制备的复合脂质体 Lip-Lupeol & ICG 能够有效包封羽扇豆醇和 ICG,且粒径均一(集中在 150 nm 附近),分散性良好(PDI 约为 0.05),能够有效被结肠癌细胞摄取。复合脂质体中 ICG 和羽扇豆醇的包封率分别达到了 29.2% 和 42.1%。采用 808 nm 激光以 200 mW/cm^2 照射 20 min 后,包封在其中的药

物能够通过 ICG 诱导的光热升温作用快速释放,光热作用可使结肠癌细胞活性下降至 59.6%。间隔 10 min 后继续照射 10 min 这种方式利用释放游离 ICG 的光动力作用可使结肠癌细胞活性进一步降低至 43.4%,在该方式的基础上加入 NK 细胞后,由于释放的羽扇豆醇对 NK 细胞活性的增强作用,可将结肠癌细胞活性进一步降至 16.7%。可见, Lip-Lupeol & ICG 在发挥 ICG 光学疗法作用的同时可以协同羽扇豆醇结合 NK 细胞过继疗法实现光-免疫协同增强的结肠癌细胞抑制效果。

目前,笔者仅对 Lip-Lupeol & ICG 的体外结肠癌细胞抑制进行了部分研究,光学疗法对 NK 细胞作用的影响以及在体研究将在后续进行,但目前的这些研究结果已经证明基于 ICG 脂质体的光学治疗可以有效地与羽扇豆醇等天然免疫活性分子的免疫增强作用结合实现较好的光-免疫协同作用,这可为相关药物的临床转化以及开发新的肿瘤光学和免疫治疗提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Gurba A, Taciak P, Sacharczuk M, et al. Gold (III) derivatives in colon cancer treatment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2): 724.
- [2] Zhang Y J, Feng Y Y, Huang Y Q, et al. Tumor-targeted gene silencing IDO synergizes PTT-induced apoptosis and enhances anti-tumor immunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 968.
- [3] Huang X H, Jain P K, El-Sayed I H, et al. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles[J]. *Lasers in Medical Science*, 2008, 23(3): 217-228.
- [4] El-Sayed I H, Huang X H, El-Sayed M A. Selective laser photothermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles[J]. *Cancer Letters*, 2006, 239(1): 129-135.
- [5] Huang X H, El-Sayed I H, Qian W, et al. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(6): 2115-2120.
- [6] Alander J T, Kaartinen I, Laakso A, et al. A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery[J]. *International Journal of Biomedical Imaging*, 2012, 2012: 940585.
- [7] 杨威, 邹千里, 周扬, 等. 水溶性苯叉环戊酮染料的双光子光动力性能研究[J]. *光学学报*, 2011, 31(s1): s100118. Yang W, Zou Q L, Zhou Y, et al. Study on water-soluble benzylidene cyclopentanone dyes for two-photon induced photodynamic therapy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, 31(s1): s100118.
- [8] 刘婉华, 刘健. 光动力作用诱导人宫颈癌细胞 HeLa 凋亡的红外光谱分析[J]. *激光与光电子学进展*, 2010, 47(8): 083001. Liu W H, Liu J. Infrared spectroscopy study on apoptosis of human cervix cancer cells induced by photodynamic therapy[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2010, 47(8): 083001.
- [9] Weissleder R. A clearer vision for *in vivo* imaging[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(4): 316-317.
- [10] Sharma R, Wendt J A, Rasmussen J C, et al. New horizons for imaging lymphatic function[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1131(1): 13-36.
- [11] Schaafsma B E, Mieog J S, Hutteman M, et al. The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery[J]. *Journal of Surgical*

- Oncology, 2011, 104(3): 323-332.
- [12] Abels C, Fickweiler S, Weiderer P, et al. Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation[J]. Archives of Dermatological Research, 2000, 292(8): 404-411.
- [13] Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: a review[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(6): 8509-8521.
- [14] Tan S Z, Li D P, Zhu X. Cancer immunotherapy: pros, cons and beyond[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 124: 109821.
- [15] Castano A P, Mroz P, Hamblin M R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity[J]. Nature Reviews Cancer, 2006, 6(7): 535-545.
- [16] Huang T Y, Huang G L, Zhang C Y, et al. Supramolecular photothermal nanomedicine mediated distant tumor inhibition via PD-1 and TIM-3 blockage[J]. Frontiers in chemistry, 2020, 8: 1.
- [17] Xu L, Zhang W, Park H B, et al. Indocyanine green and poly I: C containing thermo-responsive liposomes used in immune-photothermal therapy prevent cancer growth and metastasis[J]. Journal for immunotherapy of cancer, 2019, 7(1): 1-14.
- [18] Song G B, Luo Q, Qin J, et al. Effects of oxymatrine on proliferation and apoptosis in human hepatoma cells[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2006, 48(1): 1-5.
- [19] Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil[J]. Alternative Medicine Review, 2007, 12(4): 331-342.
- [20] Lee H A, Kim M J, Han J S. Alleviating effects of lupeol on postprandial hyperglycemia in diabetic mice[J]. Toxicology Research, 2021, 10(3): 495-500.
- [21] Zhong J H, He C L, Xu F T, et al. Lupeol inhibits osteosarcoma progression by up-regulation of HMGA2 via regulating miR-212-3p [J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2020, 15(1): 374-383.
- [22] 蒋亦雯, 洪丹, 楼哲丰, 等. 羽扇豆醇通过抑制 RhoA-ROCK1 信号通路抑制结肠癌细胞增殖[J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(2): 186-194.
- Jiang Y W, Hong D, Lou Z F, et al. Lupeol inhibits proliferation of colorectal cancer cells by suppressing RhoA-ROCK1 signaling pathway[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2020, 42(2): 186-194.
- [23] Wu X T, Liu J Q, Lu X T, et al. The enhanced effect of lupeol on the destruction of gastric cancer cells by NK cells[J]. International Immunopharmacology, 2013, 16(2): 332-340.

Photoimmune Synergistic Inactivation of Colon Cancer Cells Using Indocyanine Green and Lupeol Composite Liposomes

Qin Fen, Zhang Han, Zhang Lan, Yao Cuiping*, Wang Sijia**, Zhang Zhenxi

Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, Institute of Biomedical Photonics and Sensing, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China

Abstract

Objective Colon cancer is a solid tumor with strong immunogenicity that is prone to metastasis in its early stages. Traditional single-treatment methods have limited efficacy; therefore, the development of new, safe, effective treatment strategies has become urgent. Natural killer (NK) cell-mediated immunotherapy can kill tumor cells in a nonspecific antigen manner and has good prospects for the treatment of malignant tumors. However, because of the common immune escape mechanism in malignant tumor tissues, the activity and infiltration of NK cells in tumor tissues are insufficient, making it difficult to effectively eliminate tumor cells. Recently, it was found that photothermal therapy (PTT) and photodynamic therapy (PDT), which induce local hyperthermia or reactive oxygen species in tumor tissues via laser-induced phototherapy, not only directly induce apoptosis and necrosis of tumor cells but also improve the immunosuppressive environment in tumor tissues by inducing immunogenic death of tumor cells. This promotes the infiltration and activity of immune cells, including NK cells, in tumor tissues. As a pure natural edible substance and a potential anticancer molecule in plants, lupeol directly promotes tumor cell apoptosis and NK cell activity, making it easier for NK cells to recognize and eliminate tumor cells. In this study, we investigated the synergistic effect and mechanism of a nanoliposome carrier combined with FDA-approved indocyanine green (ICG)-mediated optical therapy and the natural molecule, lupeol, in enhancing NK cell activity for colon cancer cell inactivation. The results show that Lip-Lupeol & ICG reduced colon cancer cell activity to 59.6% after 20 min of irradiation and 43.4% after 20 min+10 min of irradiation. When NK cells are added after 20 min+10 min of irradiation, the activity decreased to 16.7%, providing a new approach for colon cancer treatment.

Methods The use of nanoliposomes as carriers to encapsulate the photosensitizer, ICG, and the natural anticancer product, lupeol, in fruits and vegetables to prepare nanoliposome drugs with uniform particle size and good stability (Lip-Lupeol & ICG) was used to achieve the synergistic amplification of PTT and PDT with lupeol-mediated NK cell immunotherapy. Lip-Lupeol & ICG can induce apoptosis of colon cancer cells and trigger immune responses through ICG-PDT under 808 nm laser radiation. In addition, it can release encapsulated lupeol to activate NK cells, thereby facilitating the accurate identification of colon cancer cells. Lip-Lupeol & ICG exhibits excellent tumor-killing effects and stimulates NK cell immune responses, achieving a synergistic therapeutic effect of NK cell immune enhancement and photodynamic therapy mediated by lupeol.

Results and Discussions The prepared Lip-Lupeol & ICG has a typical phospholipid bilayer liposome structure, with bilayer vesicles for drug encapsulation and intracellular delivery. The particle size is approximately 144–153 nm, and the stability is good for 14 d. Lupeol and ICG were successfully encapsulated. Next, under the irradiation of an 808 nm laser on the liposome causing

structural rupture, the encapsulated Lip-Lupeol & ICG were released rapidly. After 18 min, the accumulation of ICG reached 82.1%, indicating the photothermal response of Lip-Lupeol & ICG to laser irradiation. ICG-encapsulated liposomes enter tumor cells through endocytosis and induce severe cytotoxicity through PTT and PDT under a laser irradiation of 808 nm. In addition, lupeol synergistically enhances NK cell activity-mediated immunotherapy to achieve synergistic photodynamic immune antitumor effects.

Conclusions In this study, a lipid nanocarrier system was designed to synergistically integrate the NK immune enhancement of lupeol and ICG-mediated optical therapy and achieve controlled release. Both were effectively integrated to achieve precise targeting of lupeol and ICG to colon cancer cells, thereby enhancing the indirect immune response and anticancer effects of lupeol by promoting NK cell activity.

Key words medical optics; indocyanine green; lupeol; photodynamic therapy; photothermal therapy; natural killer cell immunotherapy