

文章编号: 1005-5630(2024)01-0015-08

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5630.202302280032

光激活膀胱癌焦亡的新型药物的研究

郑科杰, 郑璐璐

(上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 上海 200093)

摘要: 设计了一种利用牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 包裹吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 和 RG108 的纳米材料 ICG/RG108@BSA。吲哚菁绿在近红外激光诱导下可以活化 Caspase-3 蛋白, RG108 通过抑制 DNA 甲基化来上调 GSDME 蛋白表达, 从而增强了 Caspase-3 蛋白切割 GSDME 蛋白引起的膀胱癌细胞焦亡。ICG/RG108@BSA 具有优异的生物相容性, 能够被膀胱癌细胞有效吞噬。ICG/RG108@BSA 在 755 nm 激光激活下, 会对膀胱癌细胞产生明显的杀伤效果, 其中小鼠膀胱癌细胞 Mb49 的存活率仅为 6.9%, 人膀胱移行细胞癌细胞 T24 的存活率仅为 10.7%。同时 755 nm 激光激发的 ICG/RG108@BSA 材料也成功诱导了膀胱癌细胞焦亡, 为膀胱癌的肿瘤免疫治疗提供了有利的条件。

关键词: 吲哚菁绿; 膀胱癌; 去甲基化; 细胞焦亡

中图分类号: TB 34 **文献标志码:** A

Research of the novel drug for photoactivated pyroptosis of bladder cancer

ZHENG Kejie, ZHENG Lulu

(School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: In this paper, a nanomaterial named ICG/RG108@BSA was designed to encapsulate indocyanine green (ICG) and RG108 using bovine serum protein (BSA). Indocyanine green activated protein Caspase-3 under near infrared laser induction and RG108 up-regulated the expression of GSDME by inhibiting DNA methylation, thus enhancing the pyroptosis of bladder cancer cells caused by Caspase-3 cleavage. ICG/RG108@BSA had excellent biocompatibility, which was effectively phagocytosed by bladder cancer cells. ICG/RG108@BSA produced significant killing effect on bladder cancer cells when activated by 755 nm laser, in which the survival rate of Mb49 was only 6.9% and the survival rate of T24 cells was only 10.7%. The 755 nm laser-excited ICG/RG108@BSA nanomaterial also successfully induced bladder cancer cell pyroptosis, providing a favorable therapeutic condition for tumor immunotherapy of bladder cancer.

Keywords: indocyanine green; bladder cancer; demethylation; pyroptosis

收稿日期: 2023-02-28

基金项目: 上海市军民融合发展专项资金科技创新支持项目 (2020-jmrh-kj8)

第一作者: 郑科杰 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为光动力治疗。E-mail: 18758292095@163.com

通信作者: 郑璐璐 (1982—), 女, 副教授, 研究方向为医用光学和微纳加工。E-mail: llzheng@usst.edu.cn

引 言

膀胱癌是人类最常见的泌尿生殖系统恶性肿瘤之一,其发病率常年位于泌尿系统恶性肿瘤发病率的首位^[1]。治疗膀胱癌可用的方法包括手术治疗、放疗、化疗、内分泌治疗、分子靶向治疗和免疫治疗^[2-4]。最新研究表明,细胞焦亡在泌尿系统恶性肿瘤的发生和发展中起着重要作用^[5]。焦亡是一种炎症依赖性和自级联扩增类型的程序性细胞死亡,是激活局部免疫反应和提高抗癌功效的有效手段^[6]。它涉及由 Gasdermin 家族蛋白调节的炎症过程,其特征是膜穿孔、细胞肿胀和细胞破裂^[7]。化疗药物能激活 Caspase-3 蛋白并切割 GSDME 蛋白, N 端片段穿透膜并破坏其渗透屏障,导致细胞焦亡,细胞内容物释放,激活免疫系统^[8]。焦亡水平还可作为膀胱肿瘤患者预后和生存的预测因素^[9]。因此,细胞焦亡能为泌尿系统恶性肿瘤的治疗提供新的思路和治疗靶点,焦亡诱导剂的开发和应用具有很大的潜力。

大多数肿瘤细胞 GSDME 蛋白的表达远低于正常细胞,这归因于 DNFA5 基因启动子的甲基化^[10]。联合使用去甲基化药物是上调 GSDME 蛋白表达的重要手段,它可以实现肿瘤细胞中 GSDME 蛋白沉默的逆转,促进焦亡现象的发生^[11]。Fan 等^[12]使用去甲基化药物地西他滨与化疗纳米药物相结合的策略激活了 GSDME 蛋白介导的细胞焦亡。Cao 等^[13]使用去甲基化药物阿扎胞苷显著提高了细胞焦亡的发生率。Zheng 等^[14]使用去甲基化药物 RG108 联合铍基光敏剂诱导细胞快速焦亡,并重塑了肿瘤免疫治疗的微环境。RG108 是一种非核苷的 DNA 甲基转移酶抑制剂,能阻断 DNA 甲基转移酶的活性位点,引起抑癌基因的去甲基化和再激活,在调控 GSDME 蛋白方面具有巨大的应用价值^[15]。

吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)是唯一被美国食品药品监督管理局、欧洲药品管理局及中国国家食品药品监督管理局认证,可用于临床的近红外荧光染料^[16]。ICG 的吸收光谱和荧光光谱处于近红外区,其吸收波段在 700~900 nm 范围内,并在 750~950 nm 之间发射荧光^[17]。ICG 可通过低剂量近红外光激活诱导细胞质中 Ca^{2+} 浓度的急剧升高,从而促进细胞色素 c 的释

放,随后激活 Caspase-3 蛋白^[18]。同时,ICG 也是一种很有前途的可用于肿瘤光动力治疗(photo dynamic therapy, PDT)的光敏剂^[19]。在 PDT 中使用 ICG 的主要缺点是:ICG 具有不稳定性(水不稳定性、光降解和热降解);ICG 与脂蛋白能高度结合,这会导致其被迅速从体内清除掉^[20]。因此,开发一种生物相容性好且能为 ICG 分子提供高效的水稳定性、光稳定性和热稳定性的材料意义重大。

根据细胞焦亡的原理,选取在近红外光下可激活 Caspase-3 蛋白的吲哚菁绿和去甲基化药物 RG108 来实现细胞焦亡。通过超声破碎的方法,将水相的牛血清蛋白包裹有机相的吲哚菁绿和 RG108,形成新型的光促焦亡药物。通过一系列体外实验验证药物的生物相容性和对膀胱癌细胞的杀伤作用,为膀胱癌的治疗提供了一种全新的策略。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

磷酸盐缓冲溶液(phosphate balanced solution, PBS)、RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自赛默飞公司, CCK-8 试剂盒购自碧云天公司, Hoechst 33342 细胞核染色试剂、Calcein-AM/PI 双染试剂盒、SYTOX Green 试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司,吲哚菁绿、RG108 购自美国 MedChemexpress 生物科技公司。

使用的仪器主要有: Tecnai-F20 s-twin 型透射电子显微镜(美国), Shimadzu UV-2600 紫外-可见漫反射光谱仪(日本), Tecan Spark 多功能酶标仪(瑞士), Carl Zeiss LSM 900 激光共聚焦显微镜(德国)。

1.2 材料制备

ICG/RG108@BSA 是通过超声波辅助水包油乳化法组装的,这是形成和制备纳米级乳液的常用方法^[21]。ICG 和 RG108 在二氯甲烷(有机相)中溶解性良好,而牛血清蛋白在 H_2O (水相)中溶解性良好。将 5 mg 吲哚菁绿和 1 mg 的 RG108 溶于 1 mL 的二氯甲烷中,将 30 mg 的牛血清蛋

白溶于去离子水中。在超声破碎作用下, 两相形成了均匀的水包油乳液。将二氯甲烷用旋转蒸发器蒸发去除后, 再用 0.7 μm 玻璃纤维滤膜过滤乳液, 得到 ICG/RG108@BSA 纳米材料。

1.3 材料形貌的表征

用移液枪吸取 10 μL 的 ICG/RG108@BSA 溶液滴加到带有支持膜的铜网上, 在室温下等待样品干燥, 从而使其均匀地分散到支持网上。再用 Tecnai-F20 s-twin 型透射电子显微镜拍摄 ICG/RG108@BSA 材料的形貌和尺寸。

1.4 材料紫外吸收光谱的测定

先用水溶液进行基线测试, 然后再用去离子水将 ICG/RG108@BSA 原溶液稀释到合适的浓度, 使用 Shimadzu UV-2600 紫外-可见漫反射光谱仪探测 ICG/RG108@BSA 的紫外吸收光谱。

1.5 细胞培养

小鼠膀胱癌细胞(MB49)和人膀胱移行细胞癌细胞(T24)均用含有胎牛血清(体积分数为10%)以及双抗(体积分数为1%)的 RPMI 1640 培养基培养, 并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% 的 CO_2 细胞恒温箱内培养。

1.6 细胞摄取实验

本实验采用 Hoechst 33342 染色液对细胞核进行定位, 它在嵌入双链 DNA 后可以释放出强烈的蓝色荧光^[22]。Mb49 和 T24 细胞在共聚焦培养皿中培养过夜后, 分别用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ICG/RG108@BSA 孵育 1 h 或 24 h, 然后用 PBS 清洗, 并进一步用 Hoechst 33342(1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 孵育 10 min, 再用 PBS 清洗 3 次, 然后使用共聚焦显微镜来观察不同时间段细胞的吞噬情况。

1.7 细胞毒性实验

将 T24 细胞和 Mb49 细胞分别接种在不同的 96 孔板中, 培养 24 h 后吸出孔内原有培养基, 在不同的组别中分别加入新鲜培养基、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RG108 以及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ICG/RG108@BSA。使用 755 nm 激光器(激光功率密度为 500 mW/cm^2) 照射各孔 5 min 后, 将 96 孔板置于细胞恒温培

养箱中继续培养 24 h。将各孔中溶液替换为含 CCK-8 的培养基, 其中 CCK-8 占细胞培养基体积的 1/10。将 96 孔板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱内培养 1 h 后取出, 放入 Tecan Spark 多功能酶标仪, 测量 450 nm 时的吸光度。

1.8 细胞死活染色

将 T24 和 Mb49 细胞分别接种在共聚焦小皿中过夜。细胞贴壁后, 每种细胞分别设置 Control 组、RG108 组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、ICG/RG108@BSA 组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 3 个组进行处理。每个小皿均使用 755 nm 激光器(500 mW/cm^2) 照射 5 min。细胞处理 24 h 后, 使用 Calcein-AM/PI 双染试剂盒将细胞染色 10 min。用 PBS 清洗 3 次后, 使用 Carl Zeiss LSM 900 激光共聚焦显微镜观察各组细胞。其中红色荧光代表死细胞, 绿色荧光代表活细胞, 用 ImageJ 软件进行荧光强度分析。

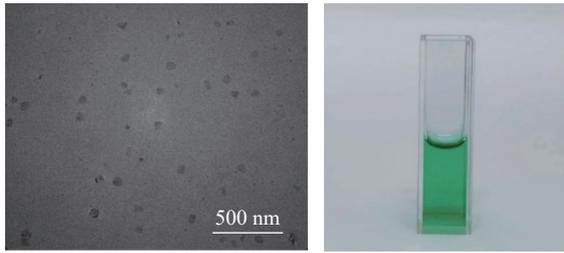
1.9 细胞焦亡形态表征

将 Mb49 细胞和 T24 细胞分别接种到共聚焦培养皿中。待细胞贴壁后, 分别用 RG108(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、ICG/RG108@BSA(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 Mb49 细胞和 T24 细胞, 其中 Control 组用新鲜培养基换液。每个小皿均使用 755 nm 激光器(500 mW/cm^2) 照射 5 min。6 h 后, 用浓度为 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 SYTOX Green 在黑暗培养箱中对膀胱癌细胞染色 10 min。用 PBS 清洗 3 次后, 各组细胞被置于共聚焦显微镜下以观测细胞的死亡情况和焦亡形态。

2 结果与讨论

2.1 ICG/RG108@BSA 的形态表征

利用透射电子显微镜对 ICG/RG108@BSA 的形貌和尺寸进行表征。如图 1(a)所示, ICG/RG108@BSA 呈现为规则均一的球状纳米颗粒, 通过统计得到其平均粒径约为 80 nm。如图 1(b)所示, 置于比色皿中的 ICG/RG108@BSA 呈现出清澈的绿色, 且无明显沉淀物, 证明该材料具有优异的水溶性, 在水中分散良好。由此可知, ICG 和 RG108 被 BSA 成功包裹, 可以用于后续实验。



(a) ICG/RG108@BSA 的 TEM 图像 (b) ICG/RG108@BSA 溶液

图 1 ICG/RG108@BSA 的形态表征图

Fig. 1 Morphological characterization of ICG/RG108@BSA

2.2 ICG/RG108@BSA 的紫外吸收光谱

如图 2 所示, ICG/RG108@BSA 的紫外-可见光(UV-vis)吸收光谱显示其在 700~800 nm 之间具有较强的光吸收能力。该波段的光相对于可见光在组织内穿透力更强。近红外光在组织的吸收、散射和自发荧光背景都比较低,且穿透组织深度较其他波段光更深,对生物体造成的光损伤小^[23]。本文选取的 755 nm 近红外激发光源可以有效匹配材料的吸收光谱性能。

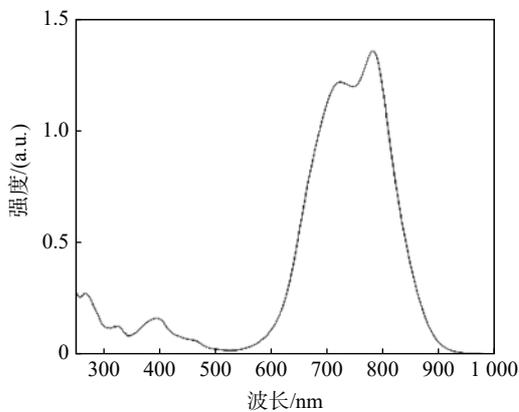


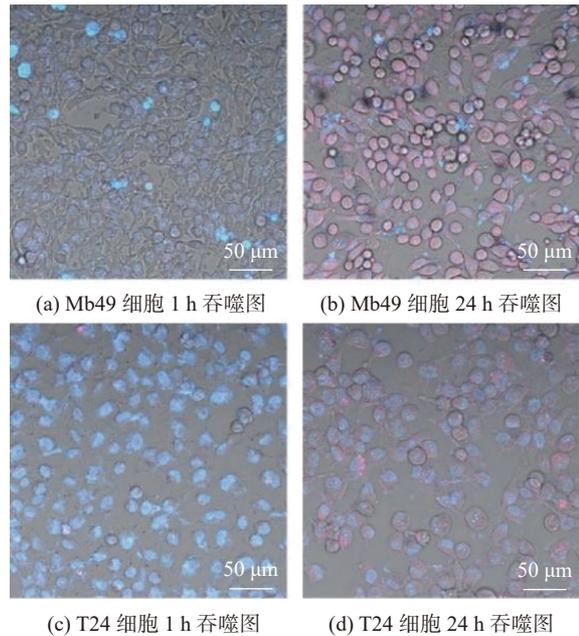
图 2 ICG/RG108@BSA 的紫外-可见吸收光谱图

Fig. 2 Ultraviolet and visible spectrum of ICG/RG108@BSA

2.3 ICG/RG108@BSA 的细胞吞噬情况

为了验证近红外激发下 ICG/RG108@BSA 的治疗效果,使用人膀胱移行细胞癌细胞 T24 以及小鼠膀胱癌细胞 Mb49 进行了体外验证。细胞摄取足够的材料,可有效增加光动力治疗的效率^[24]。首先验证了 T24 以及 Mb49 细胞对 ICG/RG108@BSA 的吞噬效果。ICG 在共聚焦激光的激发下会被探测到红色荧光,可用于观测材料在细胞中的相对位置^[25-26]。结果如图 3 所示,与 ICG/RG108@BSA 溶液共孵育 24 h 后,

T24 和 Mb49 细胞在共聚焦激光激发下被探测到明显的红色荧光,且该荧光比仅共孵育 1 h 组更亮。由此可见,所制材料具有良好的生物相容性,且在细胞内能够稳定存留 24 h,并能维持其性能。同时也证明, T24 和 Mb49 细胞对 ICG/RG108@BSA 具有良好的吞噬效果。



(c) T24 细胞 1 h 吞噬图 (d) T24 细胞 24 h 吞噬图

图 3 膀胱癌细胞对 ICG/RG108@BSA 的吞噬图

Fig. 3 Cell uptake images of ICG/RG108@BSA

2.4 ICG/RG108@BSA 细胞毒性实验

进一步探究了膀胱癌细胞内的 ICG/RG108@BSA 在激光照射下是否会对肿瘤细胞产生杀伤作用。结果如图 4 所示, ICG/RG108@BSA 在 755 nm 激光激发下,对膀胱癌细胞具有一定的杀伤效果。其中,当 ICG/RG108@BSA 质量浓度为 100 μg/mL 时,在激光照射下, Mb49 细胞存活率为 6.9%(见图 4(a)), T24 细胞存活率仅为 10.7%(见图 4(b)),说明 ICG/RG108@BSA 对癌细胞具有很强的细胞毒性。此结果在一定程度上验证了 ICG/RG108@BSA 可用于人膀胱癌以及小鼠膀胱癌的治疗。

2.5 细胞死活情况研究

Calcein-AM 通常与死细胞荧光探针碘化丙啶(PI)结合使用,对活细胞和死细胞进行双重荧光染色,以确定细胞的状态^[27]。如图 5(c)和(g)所

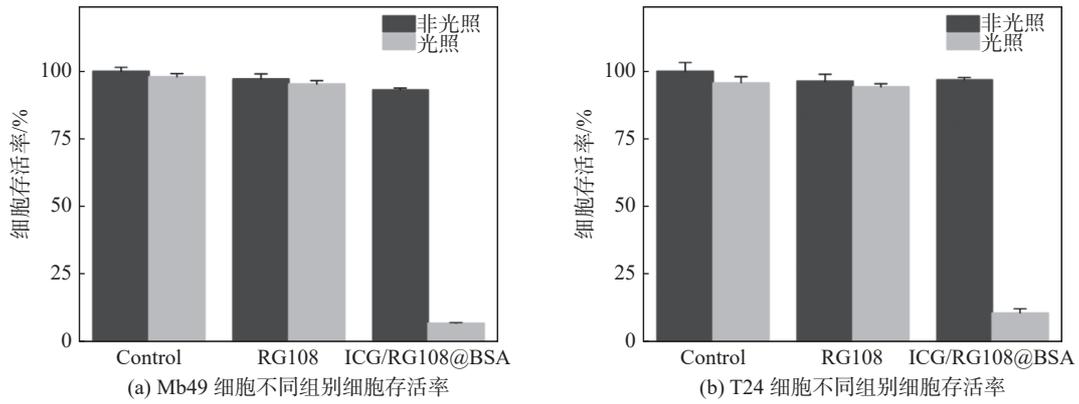


图 4 膀胱癌 Mb49 和 T24 细胞的存活率

Fig. 4 Cell viability assay of Mb49 and T24 cells

示, Mb49 细胞和 T24 细胞的 ICG/RG108@BSA 组红色荧光均较强, 绿色荧光较弱, 证明有大量的 Mb49 细胞和 T24 细胞死亡。而在

Control 组和 RG108 组中几乎没有观察到红色荧光, 只探测到绿色荧光, 证明这些组别中细胞存活状态良好(见图 5(a),(b),(e)和(f))。由荧光

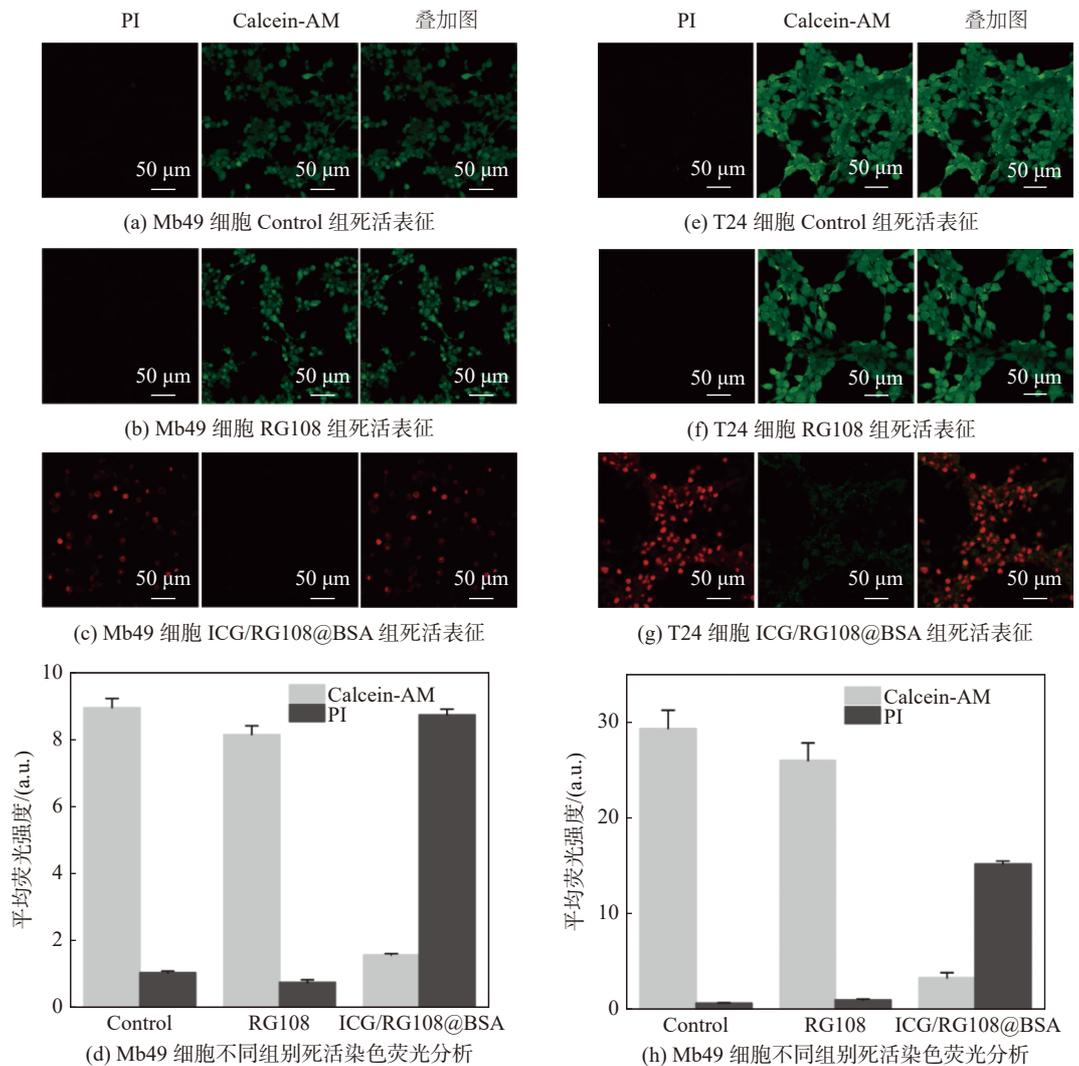


图 5 活/死细胞染色共聚焦荧光图

Fig. 5 Confocal fluorescence images of live-dead cell staining

定量分析结果可知，ICG/RG108@BSA 材料和光刺激共同作用下的 Mb49 细胞的红色荧光强度约为其他组的 8 倍(见图 5(d))，ICG/RG108@BSA 材料和光刺激共同作用下的 T24 细胞的红色荧光强度约为其他组的 15 倍(见图 5(h))。因此，活/死细胞的染色结果证实了光刺激的 ICG/RG108@BSA 材料能有效地杀死膀胱癌细胞，这与 CCK-8 检测的结果一致。

2.6 细胞焦亡情况

绿菁 SYTOX 是一种死细胞核酸染料，在焦亡图像拍摄时被用来定位死细胞位置^[28]。在

488 nm 激光激发下它会产生明亮的绿色荧光，因此通常可用绿色荧光来指示死亡细胞^[29]。图 6 是共聚焦显微镜下拍摄的所有组别细胞中的绿菁 SYTOX 染色情况和形态表征。ICG/RG108@BSA 组中出现了大量绿色荧光(见图 6(c)和(g))，而 Control 组和 RG108 组中并没有出现绿色荧光(见图 6(a)，(b)，(e)和(f))，说明经过 755 nm 激光照射之后，ICG/RG108@BSA 表现出了细胞杀伤性，导致膀胱癌细胞死亡。在共聚焦显微镜明场的视野下，Control 组和 RG108 组中的细胞形态都没有发生明显变化，而如图 6(d)和(h)所示，ICG/RG108@BSA 组细

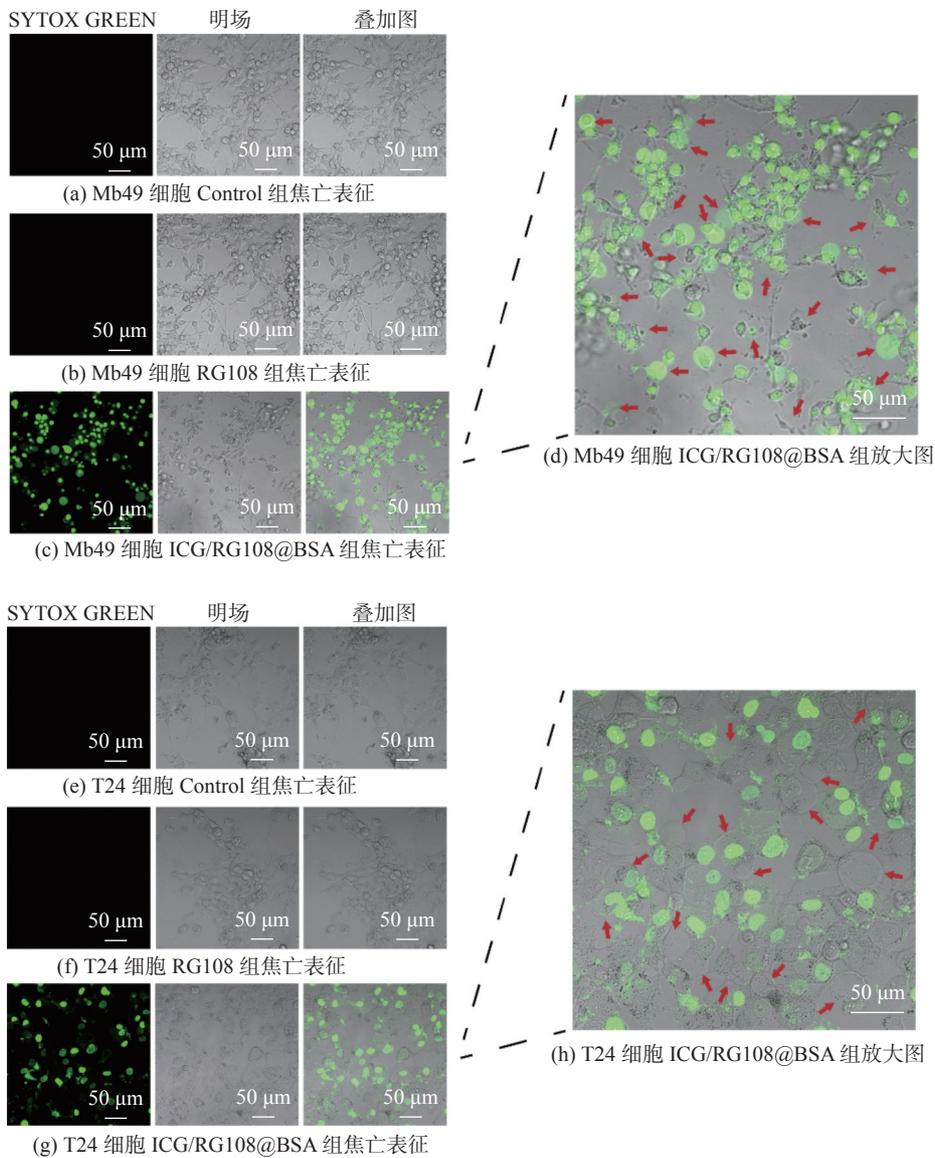


图 6 膀胱癌 Mb49 和 T24 焦亡形态表征

Fig. 6 The characterization of pyroptosis of Mb49 and T24 cells

胞在光照 6 h 后形态发生了显著变化。在 ICG/RG108@BSA 组可以明显观察到 Mb49 细胞和 T24 细胞均呈现出肿胀状态, 细胞膜与细胞内容物出现分离的趋势, 表现出典型的焦亡细胞形态, 其中红色箭头指向的是已发生焦亡的细胞。由此可见, 制作合成的 ICG/RG108@BSA 在光激活下能够诱导膀胱癌细胞 Mb49 和 T24 发生焦亡, 并使细胞产生显著的细胞毒性。

3 结 论

通过超声波辅助水包油乳化法, 用牛血清蛋白组装了吲哚菁绿 (ICG) 与去甲基化药物 RG108, 合成了新型纳米材料 ICG/RG108@BSA。该材料在 700~800 nm 的近红外波段内具有优异的光吸收能力。细胞吞噬实验证明了其出色的生物相容性和细胞内的稳定性, 这可有效避免药物的失效。细胞毒性实验和细胞活/死染色实验证明了近红外激发下的 ICG/RG108@BSA 材料对于膀胱癌细胞 Mb49 和 T24 的杀伤效果十分显著。755 nm 激光可以诱导经 ICG/RG108@BSA 材料孵育的膀胱癌细胞发生焦亡, 有利于激活免疫反应。该研究结果在膀胱癌治疗领域具有十分广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 薛晓强, 纪志刚, 谢焱. 肌层浸润性膀胱癌的保留膀胱综合治疗 [J]. *国际外科学杂志*, 2022, 49(10): 649 – 653.
- [2] 张琳, 平秦榕, 杨萌, 等. 膀胱癌免疫治疗的研究进展 [J]. *山东医药*, 2021, 61(19): 100 – 103.
- [3] 梅志杰, 郭园园, 刘贝贝, 等. 免疫治疗在非肌层浸润性膀胱癌治疗中的研究进展 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2022, 42(2): 353 – 356.
- [4] 吴辉. 动脉化疗栓塞术联合 TUR-BT 治疗膀胱癌及对患者免疫功能、氧化应激和术后复发的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(19): 3410 – 3414.
- [5] ZHU W Y, YE Z P, CHEN L, et al. A pyroptosis-related lncRNA signature predicts prognosis and immune microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 101: 108268.
- [6] WANG Z, YU H L, ZHUANG W Y, et al. Cell pyroptosis in picornavirus and its potential for treating viral infection[J]. *Journal of Medical Virology*, 2022, 94(8): 3570 – 3580.
- [7] WANG Y Y, LIU X L, ZHAO R. Induction of pyroptosis and its implications in cancer management[J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 971.
- [8] TAN G, HUANG C Y, CHEN J Y, et al. Gasdermin-E-mediated pyroptosis participates in the pathogenesis of Crohn's disease by promoting intestinal inflammation[J]. *Cell Reports*, 2021, 35(11): 109265.
- [9] WEI R, LI S F, YU G H, et al. Deciphering the pyroptosis-related prognostic signature and immune cell infiltration characteristics of colon cancer[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 755384.
- [10] CROES L, BEYENS M, FRANSEN E, et al. Large-scale analysis of *DNFNA5* methylation reveals its potential as biomarker for breast cancer[J]. *Clinical Epigenetics*, 2018, 10: 51.
- [11] CROES L, DE BEECK K O, PAUWELS P, et al. *DNFNA5* promoter methylation a marker for breast tumorigenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 31948 – 31958.
- [12] FAN J X, DENG R H, WANG H, et al. Epigenetics-based tumor cells pyroptosis for enhancing the immunological effect of chemotherapeutic Nano-carriers[J]. *Nano Letters*, 2019, 19(11): 8049 – 8058.
- [13] CAO W, CHEN G D, WU L J, et al. Ionizing radiation triggers the antitumor immunity by inducing gasdermin E-mediated pyroptosis in tumor cells[J]. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 2023, 115(2): 440 – 452.
- [14] ZHENG L L, FAN Y, WANG X, et al. Nanoagonist-mediated GSDME-dependent pyroptosis remodels the inflammatory microenvironment for tumor photoimmunotherapy[J]. *Advanced Functional Materials*, 2023, 33(6): 2200811.
- [15] ASSIS R I F, WIENCH M, SILVÉRIO K G, et al. RG108 increases NANOG and OCT4 in bone marrow-derived mesenchymal cells through global changes in DNA modifications and epigenetic activation[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0207873.
- [16] LARUSH L, MAGDASSI S. Formation of near-infrared fluorescent nanoparticles for medical imaging[J]. *Nanomedicine*, 2011, 6(2): 233 – 240.
- [17] YUAN B H, CHEN N G, ZHU Q. Emission and absorption properties of indocyanine green in Intralipid

- solution[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2004, 9(3): 497.
- [18] ZHAO P F, WANG M, CHEN M, et al. Programming cell pyroptosis with biomimetic nanoparticles for solid tumor immunotherapy[J]. *Biomaterials*, 2020, 254: 120142.
- [19] HISHIKAWA H, KAIBORI M, TSUDA T, et al. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosomes has antineoplastic effects for gallbladder cancer[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(54): 5622 – 5631.
- [20] GAMAL-ELDEEN A M, EL-DALY S M, BORAI I H, et al. Photodynamic therapeutic effect of indocyanine green entrapped in polymeric nanoparticles and their anti-EGFR-conjugate in skin cancer in CD1 mice[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2013, 10(4): 446 – 459.
- [21] YU X N, DENG Y, ZHANG G C, et al. Sorafenib-conjugated zinc phthalocyanine based nanocapsule for trimodal therapy in an orthotopic hepatocellular carcinoma xenograft mouse model[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(15): 17193 – 17206.
- [22] OH H G, NAM H G, KIM D H, et al. Neuroblastoma cells grown on fluorine or oxygen treated graphene sheets[J]. *Materials Letters*, 2014, 131: 328 – 331.
- [23] XU Z Q, HUANG X T, ZHANG M X, et al. Tissue imaging of glutathione-specific naphthalimide-cyanine dye with two-photon and near-infrared manners[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(17): 11343 – 11348.
- [24] BOVIS M J, WOODHAMS J H, LOIZIDOU M, et al. Improved *in vivo* delivery of m-THPC via pegylated liposomes for use in photodynamic therapy[J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 157(2): 196 – 205.
- [25] WU M R, HUANG Y Y, HSIAO J K. Use of Indocyanine Green (ICG), a medical near infrared dye, for enhanced fluorescent imaging-comparison of organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) and Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) reporter genes[J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2295.
- [26] WANG Y X, LAN M M, SHEN D J, et al. Targeted nanobubbles carrying indocyanine green for ultrasound, photoacoustic and fluorescence imaging of prostate cancer[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 4289 – 4309.
- [27] WANG E L, LIU Y J, XU C N, et al. Antiproliferative and proapoptotic activities of anthocyanin and anthocyanidin extracts from blueberry fruits on B16-F10 melanoma cells[J]. *Food & Nutrition Research*, 2017, 61(1): 1325308.
- [28] LIU Y, WEN D, GAO J Q, et al. Methamphetamine induces GSDME-dependent cell death in hippocampal neuronal cells through the endoplasmic reticulum stress pathway[J]. *Brain Research Bulletin*, 2020, 162: 73 – 83.
- [29] ZHU Y R, XU G L, CHEN P, et al. Effects of Cr(VI)-induced calcium-sensing receptor activation on DF-1 cell pyroptosis[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 179: 257 – 264.

(编辑: 李晓莉)