

一种可用于黑色素瘤靶向递药的透明质酸纳米凝胶

王 谋, 胡 英, 覃先燕, 龚 涛, 张志荣, 符 垚*

(四川大学华西药学院, 靶向药物与释药系统教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: 黑色素瘤恶性程度高, 且发病率逐年上升。本研究制备了一种能特异性靶向黑色素瘤的透明质酸纳米凝胶, 将巯基化的透明质酸修饰于表面功能化的普朗尼克 F127-TPGS 混合胶束制备共价交联的纳米凝胶。通过测定粒径考察其体外稳定性; 细胞毒性实验考察该载体材料对细胞的毒性作用; 细胞摄取实验定量和定性考察 B16F10 黑色素瘤细胞对该纳米凝胶的摄取情况。结果显示, 本研究制备了一种 30 nm 左右的小粒径纳米凝胶, 该纳米凝胶对小鼠 3T3 成纤维细胞与小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞均无明显细胞毒性作用, 与低表达 CD44 受体的 3T3 细胞相比, 高表达 CD44 受体的 B16F10 细胞的摄取效率显著增加 ($P < 0.05$)。

关键词: 纳米凝胶; 混合胶束; 黑色素瘤; 透明质酸; CD44

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)01-0146-06

A hyaluronic acid nanogel for melanoma targeted drug delivery

WANG Mou, HU Ying, QIN Xian-yan, GONG Tao, ZHANG Zhi-rong, FU Yao*

(Key Laboratory of Drug Targeting and Delivery System, Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Melanoma is a malignant tumor with a high degree of malignancy. The incidence of melanoma keeps increasing annually. In this study, a melanoma targeted hyaluronic acid (HA) nanogel was synthesized via crosslinking of thiolated HA with terminally functionalized F127-TPGS mixed micelles. Its stability *in vitro* was evaluated by the average particle size, and the cytotoxicity of the nanogel was investigated by *in vitro* cell based assays. Next, cell uptake studies were performed to quantitatively and qualitatively investigate the uptake of the nanogels in B16F10 cells. A small sized nanogel with a diameter of 30 nm was synthesized, which was proven to be minimally cytotoxic against both 3T3 or B16F10 cells. Compared with 3T3 cells with low levels of CD44, B16F10 cells with high levels of CD44 showed significantly higher cell uptake efficiency ($P < 0.05$).

Key words: nanogel; mixed micelle; melanoma; hyaluronic acid; CD44

黑色素瘤是一种恶性肿瘤, 是最致命的皮肤癌形式之一^[1]。大多数原发性黑色素瘤患者及时诊断时可通过手术切除获得成功。然而, 恶性黑色素瘤是一种侵袭性肿瘤, 由于其侵袭性和对现有治疗方法的抵抗

性, 占皮肤癌死亡人数 80% 以上^[2,3]。黑色素瘤的转移性扩散也是导致患者预后不良的主要原因。肿瘤细胞从原发肿瘤中剥离, 通过细胞外基质迁移, 进入血液循环, 与血液成分相互作用, 黏附于内皮细胞, 渗出, 并在远处组织增殖^[4]。近年来, 多个新药被批准用于转移性黑色素瘤, 但是这种致命的疾病似乎对经典治疗方案反应不足^[3]。

为了解决黑色素瘤的难治问题, 提高化疗效果, 研究者根据肿瘤的特殊微环境进行肿瘤的选择性治疗^[5,6], 以能够增强渗透性和滞留性效应为指导原则, 设计小

收稿日期: 2019-07-19; 修回日期: 2019-08-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773654, 81690261, 81503018); 四川大学优秀青年学者基金资助项目 (2017SCU04A23); 国家重点研发计划资助项目 (2017YFC1104601); 四川省青年科技创新研究团队基金资助项目 (2016TD0001).

*通讯作者 Tel: 86-28-85503798, E-mail: yfu4@scu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0578

尺寸纳米载体以包载大分子药物或纳米药物,使大分子药物或纳米药物能够有效地在肿瘤组织中累积。

透明质酸(HA)是一种天然存在的酸性黏多糖,由葡萄糖醛酸和N-乙酰氨基葡萄糖二糖单元组成,通过交替的 $\beta(1/3)$ 和 $\beta(1/4)$ 糖苷键连接的非硫酸化糖胺聚糖,在所有结缔组织中具有高度可变的长度和分子量(106 kDa)。HA具有优异的黏弹性、水溶性、生物相容性、亲水性和低免疫原性等特点。HA的组织相容性、化学可修饰性和生物降解性使其成为组织工程的理想支架材料^[7,8]。此外,HA是细胞外基质的主要成分,具有调节细胞吸附、生长分化、润滑关节、促进血管生成和促进伤口愈合等多种生理功能^[9]。

HA对多种肿瘤细胞中过表达的CD44受体(细胞黏附蛋白家族)具有高度亲和力,在肿瘤靶向治疗和药物递送方面备受关注^[10]。CD44是一个涉及增殖、分化、血管生成和信号转导的多功能细胞膜表面蛋白,在多种类型的肿瘤细胞中均有表达,是实现靶向药物递送的一个重要靶点。由于恶性肿瘤细胞表面抗原的有效靶向性在癌症治疗中的重要性,CD44过表达细胞通常被用作研究癌症的模型肿瘤细胞^[11]。HA与其受体CD44的特异性结合可用于靶向CD44阳性的肿瘤细胞。此外,CD44受体在正常细胞上处于静止状态,即不显示与HA的结合能力,这进一步突出了靶向该受体的治疗潜力^[12]。

普朗尼克F127是一种由疏水性聚丙烯(PPO)段和亲水性聚乙烯氧化物(PEO)段组成的三嵌段共聚物^[13]。F127作为一种表面活性剂,当其浓度高于临界胶束浓度时,在水溶液中形成胶束,其疏水核心可作为疏水性小分子药物储库,在药物递送方面具有广泛应用价值。

文献^[10,14]报道黑色素瘤细胞如B16F10细胞高表达CD44受体。基于此,本研究制备了巯基化HA,并与修饰了双键的F127-TPGS混合胶束通过巯基与双键的反应交联形成小粒径透明质酸纳米凝胶(hyaluronic acid nanogel, HANG),其既可以通过纳米凝胶的小尺寸和高渗透性被动靶向肿瘤,又可以通过HA与CD44受体的高亲和力主动靶向肿瘤。该纳米凝胶达到肿瘤部位后,在肿瘤部位富集的透明质酸酶作用下,修饰的透明质酸层可被透明质酸酶降解,暴露出具有高渗透性的F127-TPGS胶束,从而有望促进递送药物在肿瘤部位的聚集。因此,该纳米凝胶有望成为肿瘤微环境响应的智能递药载体。

材料与方 法

试剂与药品 透明质酸(77 kDa,华熙福瑞达生物医药有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS)、1640培养基(美

国Hyclone公司);胰蛋白酶溶液(trypsin)、青链霉素混合液(penicillin/streptomycin)(北京索莱宝生物科技有限公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS,上海复宏生物制品有限责任公司);4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI,江苏碧云天生物有限公司);香豆素-6(C₆)-3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT,美国Sigma-Aldrich公司);实验用水为灭菌超纯水;其余试剂均为分析纯。

仪器 RE-52AA型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);激光粒度仪(英国Malvern公司);透射电镜(日本Hitachi公司);流式细胞仪(美国Beckman公司);Varioskan Flash全波长多功能酶标仪(美国Thermo-Fisher Scientific公司);LSM510型激光共聚焦显微镜(德国Carl Zeiss公司)。

细胞培养 B16F10细胞和3T3细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司)分别在含有10% FBS和青霉素/链霉素的1640培养基或DMEM高糖培养基中培养,置于含5% CO₂、饱和湿度37 °C的孵箱中连续培养。

材料的合成

巯基修饰的透明质酸(HASH)合成 参照文献^[15]方法,称取HA(77 kDa),加蒸馏水溶解制成1.25%溶液,分别加入终浓度为5 mmol·L⁻¹的1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDAC)和N-羟基丁二酰亚胺(NHS)活化2 h;称取L-半胱胺(其与透明质酸重复单元摩尔比为3:1)加至反应体系中[加少量二巯苏糖醇(DTT)以防止半胱胺氧化],再将反应体系抽真空并加氮气球,使其在氮气保护下反应12 h,然后以0.5%氯化钠(pH 3.5)溶液作为透析液,透析2天,冷冻干燥24 h,制得HASH聚合物,结构经¹H NMR核磁共振, -20 °C氮气下保存备用。

普朗尼克F127上修饰双键的F127-MAA合成 称取F127,将其溶解在无水二氯甲烷中制成5%溶液,冰浴条件下依次滴加少量三乙胺和摩尔量为1/2 F127甲基丙烯酸酐,室温反应24 h后,进行减压浓缩,用5倍体积量反应液的冰乙醚沉淀析晶,抽滤,真空干燥得双键修饰的F127。

HANG的制备 采用薄膜分散法制备5% F127-MAA+TPGS(10:1)混合胶束液2 mL。称取F127-MAA 100 mg和TPGS 10 mg,将其溶于8 mL乙腈中,蒸去乙腈,再用纯水2 mL复溶形成的薄膜,即得F127胶束;然后配置不同浓度的巯基修饰的透明质酸(0.5% HASH和1% HASH),在高速搅拌下,将不同浓度的HASH按照体积比HASH:F127-MAA胶束=1:10,滴加到F127-TPGS混合胶束溶液中,使其在碱催化(HEPES)条件下搅拌过夜。反应结束后,分别将制剂溶液装入分子质

量为3 500 Da的透析袋中透析4 h, 即得0.5% HANG和1% HANG。

包载荧光染料(C₆)的HANG的制备 在制备F127-TPGS混合胶束时, 用乙腈溶解适量浓度的C₆, 再将其加入F127-MAA/TPGS的混合溶液中, 旋转蒸发除去乙腈, 其余步骤与上述一致。

制剂的理化性质表征 通过激光粒度仪测定F127-TPGS混合胶束和0.5%、1% HANG溶液的粒径和 ζ 电位, 再通过透射电镜对其形态进行表征。

HANG稳定性考察

贮藏稳定性考察 将制备好的两种HANG溶液置于室温下, 分别于0、24和48 h时, 测定粒径以考察其稳定性。

血浆稳定性考察 将两种HANG溶液分别加入含10%大鼠血浆的PBS中, 置于37 °C, 转速为100 r·min⁻¹的恒温摇床, 于0、24和48 h时测定粒径, 以考察其稳定性。

HANG细胞毒性考察 首先取对数生长期的B16F10与3T3细胞, 制成单细胞悬液, 将细胞按1×10⁴个/孔接种于96孔板中。采用MTT法进行细胞毒性评价, 参考文献^[6,17]方法进行。接种细胞24 h后, 将不同质量浓度(10、20、50、100、200、500、1 000 μg·mL⁻¹) 0.5% HANG和1% HANG加入细胞中, 与细胞共同孵育24 h后, 每孔加MTT试液(5 mg·mL⁻¹) 10 μL, 继续培养4 h后, 吸除上清液, 每孔加DMSO 150 μL溶解, 用多功能酶标仪以490、570和630 nm作为测定波长, 测定其吸光度(A)值。每板设3个, 加入等体积PBS的阴性对照组。相对细胞活力=(各给药组A值-阴性对照组A值)/(空白对照组A值-阴性对照组A值)×100%。

细胞对HANG的摄取和摄取通路的考察 为探究CD44受体所介导细胞对HANG的摄取行为, 对高表达CD44受体的B16F10细胞与低表达CD44受体的3T3细胞进行了考察, 并制备载C₆的HANG用于以下研究。将B16F10细胞与3T3细胞按5×10⁵个/孔的接种于12孔板中, 次日长满。将包载C₆的HANG用无血清无抗的培养基稀释至0.8 μg·mL⁻¹, 分别依次加入各制剂(C₆原药、0.5% HANG和1% HANG)进行细胞摄取。每孔C₆ 0.8 μg作用2 h后, 弃去培养液, 用PBS洗涤3次后, 每孔加入胰酶200 μL, 消化完全后, 弃去胰酶, 每孔细胞用PBS 350 μL重悬, 收集于流式管内, 最后用流式细胞仪进行荧光半定量。

为探索细胞对HANG的内吞通路, 取处于对数期生长的B16F10细胞, 用胰蛋白酶溶液消化, 制成单细胞悬液并用细胞计数仪进行细胞计数。以5×10⁵个/孔的细胞数分别接种于12孔板内, 并在37 °C、5% CO₂培

养箱中孵育24 h, 然后吸除培养基, 用PBS洗涤后加入氯丙嗪(Clo)、叠氮钠(NaN₃)、甲基-β-环糊精(M-β CD)、阿米洛利(amiloride)、制霉菌素(lincomycin)和维拉帕米(verapamil)等内吞通道抑制剂, 孵育30 min后再加入1% HANG共同孵育5 min, 弃去培养液, 用PBS洗涤3次后, 每孔加入胰酶200 μL, 消化完全后弃去胰酶, 每孔细胞用PBS 350 μL重悬, 收集于流式管内, 最后用流式细胞仪进行荧光半定量。未摄取抑制剂的孵育组作为对照组。

采用激光共聚焦显微镜对HANG的摄取进行定性考察。将对数期生长的B16F10细胞以5×10⁵个/孔接种于共聚焦小皿中, 孵育24 h后, 将包载C₆的HANG用无血清无抗的培养基稀释至0.8 μg·mL⁻¹, 分别依次加入各制剂(C₆原药、0.5% HANG的HANG和1% HANG的HANG)进行细胞摄取。按每孔C₆ 0.8 μg作用2 h, 摄取结束后吸去培养液, 用PBS洗涤3次, 加入20 μg·mL⁻¹ DAPI染色5 min, 吸除DAPI, 再用PBS洗涤3次, 在激光共聚焦显微镜下进行观察。

数据分析 采用GraphPad Prism 5.0软件进行统计学分析。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用One-Way ANOVA进行统计学分析, $P < 0.05$ 具有显著性差异。

结果和讨论

1 HASH和F127-MAA的结构验证

图1A、B分别为HA和HASH的¹H-NMR图谱, 在化学位移为3.3~3.9之间的多重峰对应的是透明质酸分子中的糖环结构, 而图1B中箭头所示1.75~2.75处的信号峰归属于半胱胺分子亚甲基上的氢原子, 这表明半胱胺已共价连接至HA上。

图1C、D分别为F127与F127-MAA的¹H NMR图谱, 图1D箭头所示的5.5和6左右的两个峰分别为修饰双键上的两个氢, 且对应化学位移的峰面积积分接近1:1, 说明F127-MAA成功合成。

2 HA纳米凝胶的理化性质表征

首先, 通过薄膜分散法制备了F127-TPGS混合胶束(F127), 再通过低浓度下将F127-MAA上的双键与不同浓度HASH上的巯基交联形成纳米凝胶(0.5% HASH和1% HASH)。激光粒度仪的结果显示, F127-TPGS混合胶束的平均粒径和电位分别为25.07 ± 0.05 nm和-0.189 ± 0.036 mV(图2A), 多分散指数(PDI)为0.212 ± 0.004, 而两种纳米凝胶0.5% HASH和1% HASH的粒径和电位分别为31.92 ± 0.21 nm、-3.98 ± 0.012 mV和33.17 ± 0.19 nm、-5.24 ± 0.051 mV(图2B、C)。PDI分别为0.276 ± 0.005和0.303 ± 0.003。上述结果显示, 与F127-TPGS混合胶束相比, 两种纳米凝胶的粒径均

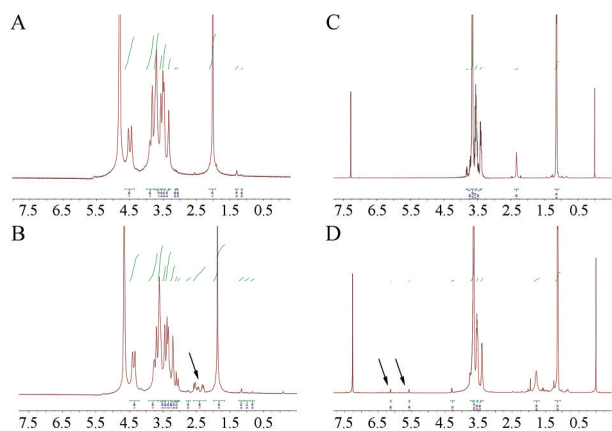


Figure 1 ¹H NMR spectra of hyaluronic acid (HA) (A), thiolated hyaluronic acid (HASH) (B), F127 (C) and F127-MAA (D)

略微增大,且电位的负值变大(HA在生理条件下带负电)。考虑到小分子电解质(HEPES)已经通过透析除

去,说明电位变负是由胶束表面修饰HA引起的。这表明HA成功地包裹于F127-TPGS混合胶束表面,HANG成功制备。

F127、0.5% HASH和1% HASH的透射电镜图、结果显示均为典型的类球形结构(图2A~C)。

3 制剂稳定性的考察

为了考察HANG的体外贮藏稳定性,在不同时间点通过动态光散射法测定该纳米凝胶的粒径,结果显示,在48 h内将两种HANG置于室温,其粒径和PDI均无明显变化(图3A、B),说明所制备制剂在48 h内具有较高的稳定性。将两种HANG置于10%血浆中,其粒径和PDI均无明显变化(图3C、D),说明所制备制剂在48 h内具有较高的血浆稳定性。

4 制剂毒性

为了探索本制剂对细胞是否有较大毒性,用3T3

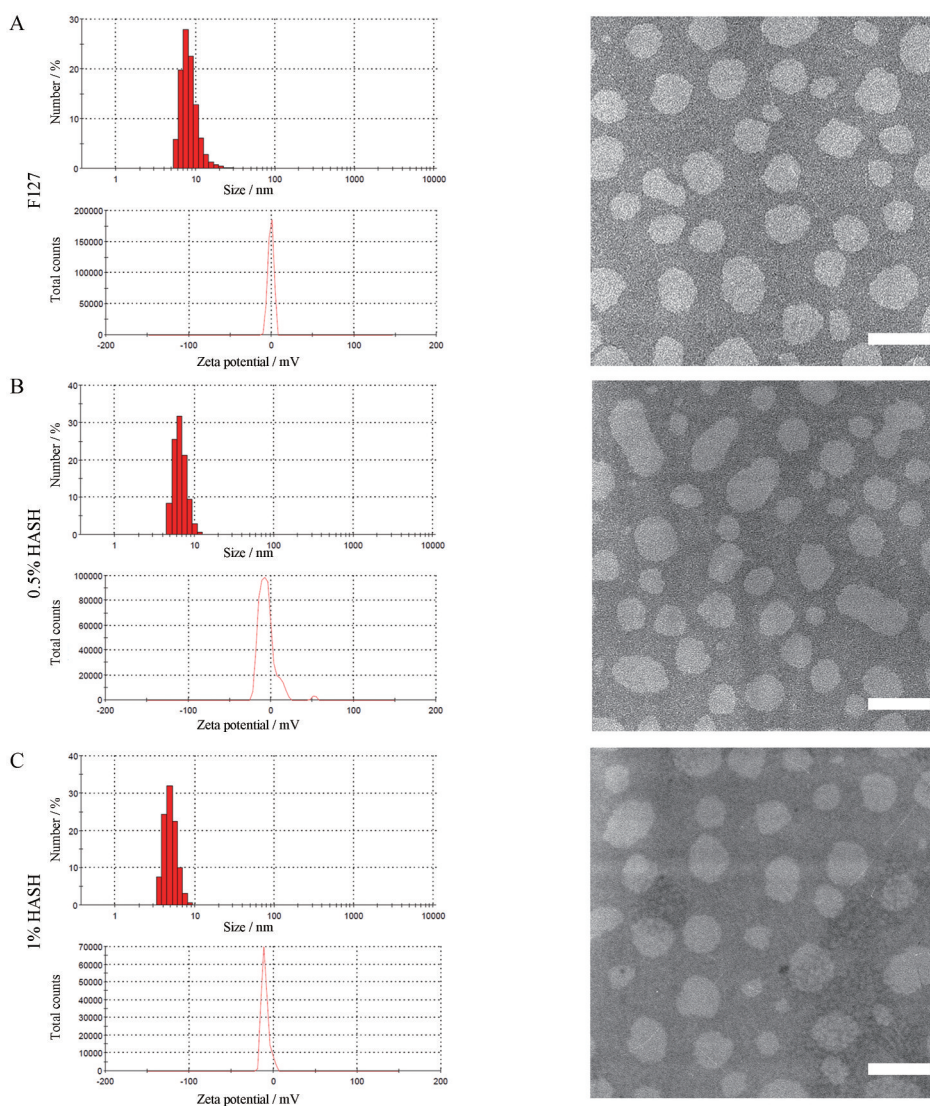


Figure 2 Physicochemical characterizations. Size distributions, surface ζ potential and morphology of F127 (A), 0.5% HASH (B) and 1% HASH (C) determined by dynamic light scattering (DLS) and transmission electronic microscopy (TEM). Scale bars represent 100 nm

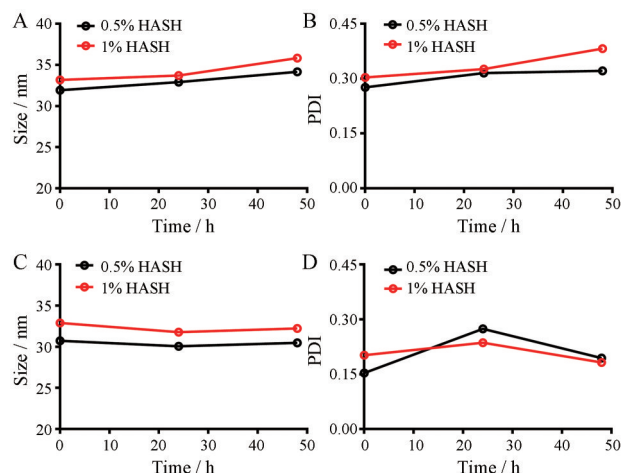


Figure 3 Storage stability and plasma stability of hyaluronic acid nanogel (HANG). Size stability (A) and polydispersity index (PDI) stability (B) at room temperature. Size stability (C) and PDI stability (D) at 10% plasma

细胞与 B16F10 细胞进行了 MTT 实验 (图 4)。结果显示, 在 $0\sim 200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内 0.5% HASH 和 1% HASH 的相对细胞活力均为 90% 左右, 这说明在此范围内, 两种纳米凝胶溶液均对 3T3 细胞和 B16F10 细胞基本无毒。

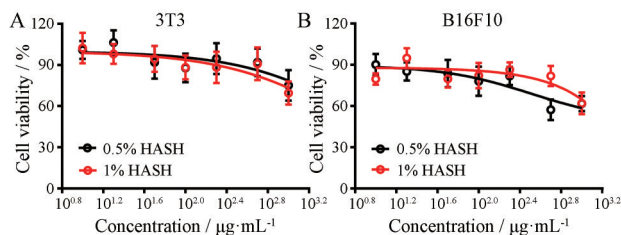


Figure 4 Cytotoxicity of two different nanogels in 3T3 (A) and B16F10 (B) cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

5 体外细胞摄取

为了研究 HANG 的细胞摄取, 本研究选择低表达 CD44 的 3T3 细胞和高表达 CD44 的 B16F10 细胞分别进行了细胞摄取实验。如图 5A 显示, 与 C_6 原药相比, 两种 HANG 制剂在 B16F10 细胞上的摄取阳性率均显著增加至近 100%, 说明胶束表面修饰 HA 后能显著增加 B16F10 细胞的摄取效率。然而, 3T3 细胞摄取实验结果表明, 修饰 HA 的 HANG 制剂能略微增加 3T3 细胞上摄取阳性率至约 20%。由此可见, HA 与 CD44 受体的亲和性可以显著增加细胞对胶束载体的摄取效率, 从而使该载体具备细胞选择性。

作者又探索了 B16F10 细胞对 HANG 的摄取通

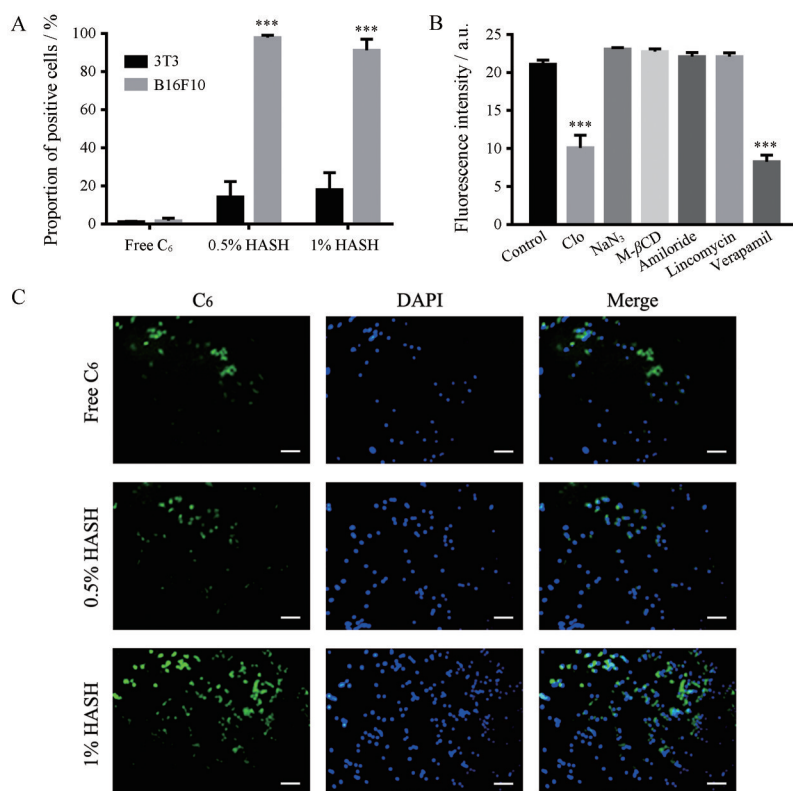


Figure 5 *In vitro* cellular uptake of nanogel. The internalization efficiencies of free coumarin-6 (C_6), 0.5% HASH and 1% HASH were quantitatively determined by flow cytometry (A). Competitive inhibition of internalization of 1% HASH with Clo, NaN_3 , $M\text{-}\beta\text{CD}$, amiloride, lincomycin and verapamil (B). Representative CLSM images of free coumarin-6, 0.5% HASH and 1% HASH internalized in B16F10 cells (C). $n = 3, \bar{x} \pm s$. $***P < 0.001$ vs 3T3 or control group. Scale bars represent $30\ \mu\text{m}$

路, 采用摄取抑制剂对细胞进行预孵育, 结果显示, 孵育了氯丙嗪和维拉帕米后, 与对照组相比, HANG 的荧光强度明显降低 (图 5B), 提示 HANG 可能是通过网格蛋白介导的内吞途径入胞。

采用共聚焦显微镜观察 HANG 的摄取情况结果, 与流式结果基本一致, HANG 组的绿色荧光 (C_6) 强度, 1% HASH > 0.5% HASH > 游离 C_6 (图 5C), 说明 HANG 能够增加 B16F10 细胞对 C_6 的摄取, 且增加表面修饰 HA 的浓度能够增加 B16F10 细胞对纳米凝胶的摄取。前期已有多篇文献证实^[11,12,18], 透明质酸可以与 CD44 受体结合而起到靶向 CD44 受体高表达的肿瘤细胞 (如黑色素瘤细胞) 的作用, 因此将该纳米凝胶应用于黑色素瘤等 CD44 受体高表达的肿瘤治疗, 有望实现靶向肿瘤而提高药物疗效的作用。

结论

本研究构建了一种透明质酸和 F127-TPGS 混合胶束共价交联的小粒径纳米凝胶, 通过 HA 和高表达的 CD44 受体之间的特异性相互作用, 可以显著增加 B16F10 细胞对 C_6 的摄取量, 且随着胶束表面修饰的透明质酸含量的增加, 摄取量相应增加。此外, 该载体材料在体外细胞毒性实验中未显示明显的细胞毒性作用。总之, 该制剂有望用于靶向黑色素瘤的药物递送研究。

References

- [1] Wang XY, He XF, Zhao FS, et al. Regulation gene expression of miR200c and ZEB1 positively enhances effect of tumor vaccine B16F10/GPI-IL-21 on inhibition of melanoma growth and metastasis [J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 68.
- [2] Park SY, Song H, Sung MK, et al. Carnosic acid inhibits the epithelial-mesenchymal transition in B16F10 melanoma cells: a possible mechanism for the inhibition of cell migration [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 12698-12713.
- [3] Zhao F, Zhang R, Wang J, et al. Effective tumor immunity to melanoma mediated by B16F10 cancer stem cell vaccine [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 52: 238-244.
- [4] Schlesinger M, Roblek M, Ortmann K, et al. The role of VLA-4 binding for experimental melanoma metastasis and its inhibition by heparin [J]. *Thromb Res*, 2014, 133: 855-862.
- [5] Jing T, Li T, Ruan Z, et al. pH- and glutathione-stepwise-responsive polypeptide nanogel for smart and efficient drug delivery [J]. *J Mater Sci*, 2018, 53: 14933-14943.
- [6] Liu L, Li T, Ruan Z, et al. Reduction-sensitive polypeptide nanogel conjugated BODIPY-Br for NIR imaging-guided chem/photodynamic therapy at low light and drug dose [J]. *Mater Sci Eng C*, 2018, 92: 745-756.
- [7] Gokila S, Gomathi T, Vijayalakshmi K, et al. Development of 3D scaffolds using nanochitosan/silk-fibroin/hyaluronic acid biomaterials for tissue engineering applications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120: 876-885.
- [8] Luo P, Liu L, Xu W, et al. Preparation and characterization of aminated hyaluronic acid/oxidizedhydroxyethyl cellulose hydrogel [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 199: 170-177.
- [9] Hanoux V, Eguida J, Fleuret E, et al. Increase in hyaluronic acid degradation decreases the expression of estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cell line [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 476: 185-197.
- [10] Shi S, Zhou M, Li X, et al. Synergistic active targeting of dually integrin $\alpha v \beta 3$ /CD44-targeted nanoparticles to B16F10 tumors located at different sites of mouse bodies [J]. *J Control Release*, 2016, 235: 1-13.
- [11] Gu J, Chen X, Ren X, et al. CD44-targeted hyaluronic acid-coated redox-responsive hyperbranched poly(amido amine)/plasmid DNA ternary nanoassemblies for efficient gene delivery [J]. *Bioconjug Chem*, 2016, 27: 1723-1736.
- [12] Lima-Sousa R, de Melo-Diogo D, Alves CG, et al. Hyaluronic acid functionalized green reduced graphene oxide for targeted cancer photothermal therapy [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 200: 93-99.
- [13] Wang Y, Gong T, Zhang Z, et al. Matrix stiffness differentially regulates cellular uptake behavior of nanoparticles in two breast cancer cell lines [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 25915-25928.
- [14] Deng C, Zhang Q, Fu Y, et al. Coadministration of oligomeric hyaluronic acid-modified liposomes with tumor-penetrating peptide-iRGD enhances the antitumor efficacy of doxorubicin against melanoma [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 1280-1292.
- [15] Huang AW, Zhao JL, Liu ZH, et al. Preparation and evaluation of insulin thiolated hyaluronic acid nanoparticles *in vitro* [J]. *Chin J Biochem Pharm (中国生化药物杂志)*, 2014, 7: 78-80.
- [16] Cao X, Zhou X, Wang Y, et al. Diblock- and triblock-copolymer based mixed micelles with high tumor penetration *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 3216-3224.
- [17] Choi SK, Park S, Jang S, et al. Cascade regulation of PPAR γ (2) and C/EBP α signaling pathways by celastrol impairs adipocyte differentiation and stimulates lipolysis in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Metabolism*, 2016, 65: 646-654.
- [18] Sapudom J, Ullm F, Martin S, et al. Molecular weight specific impact of soluble and immobilized hyaluronan on CD44 expressing melanoma cells in 3D collagen matrices [J]. *Acta Biomater*, 2017, 50: 259-270.