

鼠李糖类似物介导的脂质体递药系统及其靶向抗胰腺癌的研究

高飞燕¹, 刘鑫龙¹, 彭珊¹, 张焱^{2*}, 李翀^{1*}

(1. 西南大学药学院, 重庆 400715; 2. 重庆大学药学院, 重庆 401331)

摘要: 本文初步探究了鼠李糖类似物作为靶向配体构建递药系统, 实现胰腺癌主动靶向治疗的可行性。采用薄膜水化法成功制备了鼠李糖脂质体, 并对其理化性质、体外释放特性、体内外靶向性及体外药效学进行了初步评价。鼠李糖脂质体在体内外均能表现出针对人胰腺癌 (BxPC-3) 细胞的良好靶向性, 且具有更强的抗肿瘤效果。基于此, 进一步以鼠李糖脂天然结构类似物重楼皂苷 VII (Polyphyllin VII, PPVII) 为靶向材料及活性成分, 探索重楼皂苷 VII 脂质体 (Polyphyllin VII modified liposomes, PPVII-Lip) 对 BxPC-3 细胞的靶向性及抗肿瘤活性研究。结果表明, PPVII-Lip 粒径均一, 在体内对 BxPC-3 实体瘤有较强的靶向能力, 能够提高药物在胰腺癌肿瘤部位选择性富集。在体内、外药效评价中, 相比胰腺癌一线化疗药物吉西他滨, PPVII-Lip 对胰腺癌细胞也表现出更强的抑制效果。综上所述, 该靶向递药策略有望为靶向治疗胰腺癌的药物递送研究提供有益的思路。本研究体内动物实验得到了西南大学动物伦理委员会的批准 (批准号: IACUC-20210130-2)。

关键词: 鼠李糖脂; 重楼皂苷 VII; 靶向递药系统; 胰腺癌

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)04-1067-12

Rhamnose-analogues mediated liposomal drug delivery system for pancreatic cancer target therapy

GAO Fei-yan¹, LIU Xin-long¹, PENG Shan¹, ZHANG Yan^{2*}, LI Chong^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. School of Pharmacy, Chongqing University, Chongqing 401331, China)

Abstract: In this study, we have firstly investigated the feasibility of rhamnolipids as targeting ligands to develop drug delivery systems for active targeting of pancreatic cancer. Rhamnolipid-modified liposomes (RhaL-Lip) were prepared by a thin film hydration method, and were evaluated preliminarily for RhaL-Lip physicochemical properties, *in vitro* release characteristics, *ex/in vivo* targeting, and *in vitro* pharmacodynamics. RhaL-Lip exhibited excellent targeting ability of human pancreatic cancer (BxPC-3) cells and enhanced anti-tumor effects. On this basis, the natural structural analogue of rhamnolipid, Polyphyllin VII (PPVII), as the targeting material and active ingredient, we explored the targeting and anti-tumor activity of Polyphyllin VII modified liposomes (PPVII-Lip). The results showed that PPVII-Lip has a homogeneous particle size and has a more robust targeting ability for solid tumor *in vivo*, which can achieve more enrichment at the tumor site. Compared with gemcitabine, the first-line chemotherapy drug for pancreatic cancer, PPVII-Lip showed a stronger inhibitory effect. In conclusion, this targeted drug delivery strategy is expected to provide beneficial ideas for drug delivery studies in targeted therapy for pancreatic cancer. Animal experiments were conducted with approval from the Animal Ethics Committee of southwest university (approval number: IACUC-20210130-2).

Key words: rhamnolipid; polyphyllin VII; targeted drug delivery system; pancreatic cancer

收稿日期: 2023-11-28; 修回日期: 2024-03-16.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (32201086); 重庆市自然科学基金博士后科学基金项目 (cstc2021jcyj-bshX0125).

*通讯作者 E-mail: zhangyan2015@cqu.edu.cn; chongli@swu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1344

胰腺癌是恶性程度非常高的肿瘤之一,具有病程进展快,易转移,且预后极差等特点,其5年生存率仅为12.5%^[1]。胰腺癌被称为“沉默的杀手”,因其早期特征性症状不明显,使其临床确诊通常发生在晚期^[2]。此外,胰腺癌肿瘤外基质细胞还形成致密的生物屏障,阻碍大多数化疗药物进入深层肿瘤组织,使胰腺癌细胞对化疗药物敏感性降低及耐药性升高,这也是作为胰腺癌临床一线化疗药物的吉西他滨化疗效果不理想的主要原因^[3]。因此,亟需开发治疗胰腺癌的新型药物。

相对于正常细胞,肿瘤细胞因其糖代谢旺盛,其细胞表面往往高表达糖蛋白受体,糖基及其衍生物作为配体可实现药物对肿瘤的主动靶向^[4,5]。近年来,以葡萄糖为代表的糖基化合物修饰的肿瘤靶向递药系统的相关研究被研究人员广泛关注^[6]。然而,人体体内存在大量的内源性葡萄糖,有可能通过竞争性结合作用抑制靶向基团与肿瘤细胞表面的糖蛋白受体的结合,最终使递药系统“脱靶”进而影响药效^[7]。

凝集素(Lectin)是一种存在于动植物中的非免疫来源的糖结合蛋白,其具有多个糖结合位点,在细胞的识别和黏附反应中发挥着重要作用。不同种类的凝集素可与特定的糖基结构发生特异性结合^[8]。鼠李糖结合凝集素(rhamnose-binding lectin, RBL)可选择性识别和结合鼠李糖^[9]。研究表明RBL在多种肿瘤细胞表面表达,并且鼠李糖基在这些细胞功能中发挥重要作用^[10]。此外,由于人体自身不存在内源性鼠李糖,所以鼠李糖为靶向分子的递药系统在体内不存在内源性竞争抑制^[11]。但是,到目前为止尚未发现以鼠李糖为靶向材料构建靶向递药系统的相关研究。

本研究构建了一种以鼠李糖基团作为靶向配体,针对人胰腺癌BxPC-3细胞表面RBL受体的靶向递药系统。本文首先探讨了以鼠李糖脂作为靶向材料,构建能特异性识别人胰腺癌BxPC-3的靶向递药系统的可行性。以紫杉醇作为模型药物,鼠李糖脂修饰脂质体能显著提高紫杉醇对胰腺癌的疗效。基于此,选取鼠李糖脂天然结构类似物重楼皂苷VII(polyphyllin VII, PPVII)作为靶向材料及活性成分,进一步探索了重楼皂苷VII脂质体(PPVII-Lip)对BxPC-3细胞的靶向性及抗肿瘤活性作用。

材料与方法

材料与试剂 大豆卵磷脂(EPC,艾伟拓上海医药科技有限公司);鼠李糖脂(rhamnolipid,四川三森生物科技有限公司);PPVII(95%,成都普瑞法科技开发有限公司);DiR(1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindo-

tricarboycaine iodide-),香豆素6(coumarin 6, C6)(Sigma, USA);胎牛血清(FBS)、RPMI 1640培养基(Gibco, USA);0.25%胰蛋白酶(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);细胞周期试剂盒、细胞凋亡试剂盒(万类生物科技有限公司);TUNEL试剂盒(南京凯基生物技术有限公司)。

实验仪器 激光粒度仪(Nano ZS, Malven, UK);酶标仪(BIO-RAD MODEL 680, BIO-RAD, USA);荧光倒置显微镜(IX-73, Olympus, Japan);流式细胞仪(NovoCyte, ACEA, USA);激光共聚焦显微镜(LSM700, Zessi, Germany);小动物活体成像仪(FX PRO, Carestream, USA)。

细胞培养 人胰腺癌细胞株BxPC-3购自南京凯基生物有限公司,培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,置于饱和湿度的细胞培养箱中培养(37 °C, 5% CO₂),汇合度达到约60%~80%时,使用含EDTA的0.25% (w/v)胰蛋白酶消化传代。

实验动物 无胸腺裸鼠(雌性,6周龄)由湖南斯莱克景达实验动物有限责任公司提供,实验动物质量合格证编号:4303455942。实验按照西南大学实验动物伦理委员会及国际动物实验的指导原则进行,所有动物实验均获得了西南大学动物实验伦理委员会批准(批准号:IACUC-20210130-2)。

鼠李糖脂脂质体(RhaL-Lip)制备及表征 采用薄膜水化法制备RhaL-Lip^[7]。经过筛选,鼠李糖与大豆卵磷脂药脂比为1:30 (w/w)。精密称取大豆卵磷脂30 mg和鼠李糖脂1 mg,充分溶解于2 mL甲醇:氯仿(1:1)溶液中,并转入洁净干燥的茄形瓶。使用旋转蒸发仪在37 °C条件下减压蒸发除去有机溶剂,并加入1 mL PBS缓冲液,置于37 °C恒温水浴振荡器进行水化。收集水化后溶液,使用超声波细胞粉碎仪进行超声,600 W超声2 min。收集溶液即得RhaL-Lip。精密称取紫杉醇1 mg,上述材料成膜前加入并混合均匀,最终得到RhaL-Lip/PTX,药脂比为1:10。将制得的紫杉醇脂质体破乳后,用HPLC法测定其包封率。按相同方法制备含胆固醇的紫杉醇空白脂质体(Lip/PTX),其中胆固醇药脂比与鼠李糖脂相同,并对其表征。

按上述方法制备包载荧光素香豆素6脂质体(RhaL-Lip/C6、Lip/C6)和DiR的脂质体(RhaL-Lip/DiR、Lip/DiR),其药脂比均为1:200 (w/w),并对其进行表征。马尔文激光粒度仪对脂质体的粒径大小、zeta电位分布进行测定。

体外释放 分别取1 mL RhaL-Lip/PTX和1 mL Lip/PTX,分别装入截留分子量为8 000~14 000 Da的透析袋中,封口,释放介质为50 mL含0.1% Tween 80

的PBS缓冲液(pH 7.4),置于37℃恒温振荡器中缓慢振摇^[12]。分别于15 min、0.5、1、2、4、6、12、24 h等不同时间点各取样1 mL透析液,同时补充1 mL新鲜释放介质。使用HPLC测定不同时间点的释放介质中PTX的含量,计算累积释放率。

稳定性考察 将RhaL-Lip/PTX置于37℃环境中,分别在0、6、12、24、36、48、72 h取部分脂质体测定其粒径,初步考察体外稳定性。

BxPC-3、MCF-7细胞与鼠李糖荧光探针的特异性结合 按文献^[11]方法,利用生物素-亲和素系统的独特性质,使鼠李糖、葡萄糖上标记量子点(quantum dots, QD),观察肿瘤细胞表面鼠李糖受体的表达。分别将鼠李糖、葡萄糖与预先活化的生物素结合,再与量子点QD标记的链霉亲和素共同孵育,4℃避光保存,备用。

分别将BxPC-3细胞、MCF-7接种于激光共聚焦培养皿中,过夜培养。将细胞与鼠李糖探针在37℃下孵育30 min, PBS浸洗去除未结合的探针,4%多聚甲醛固定后,DAPI染色细胞核避光孵育5 min,使用荧光共聚焦显微镜下观察。

RhaL-Lip与不同细胞相互作用实验

竞争性抑制验证 将BxPC-3细胞接种于激光共聚焦培养皿中,在与鼠李糖-QD探针孵育之前,BxPC-3细胞先分别与过量的鼠李糖、葡萄糖于37℃预孵育1 h,以使BxPC-3细胞先被游离的糖所结合,加入PBS浸洗去除未结合的糖。然后,将BxPC-3细胞与鼠李糖探针孵育30 min, PBS浸洗后使用荧光共聚焦显微镜观察。

入胞机制研究 将BxPC-3细胞按每孔 1×10^4 个细胞接种于48孔板中,过夜培养后,向各实验孔组中加入不同的入胞抑制剂:氯丙嗪、非律平、秋水仙碱、莫能星、布雷非德菌素A、甲基- β -环糊精^[13,14]。37℃孵育0.5 h后,再分别加入50 μ L RhaL-Lip/C6或50 μ L Lip/C6(C6浓度为 $0.06 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),37℃孵育2 h。PBS浸洗3次,使用胰蛋白酶细胞消化液对孔中细胞进行消化,收集于2 mL EP管中,加入0.5 mL PBS重悬细胞,使用流式细胞仪检测各组的荧光强度。

体外靶向性评价 分别将BxPC-3细胞按每孔 1×10^4 个细胞、MCF-7细胞按每孔 5×10^3 个细胞、BGC-823细胞按每孔 1×10^4 个细胞、3T3细胞按每孔 1×10^4 个细胞均匀接种于48孔细胞培养板中,置于细胞培养箱中过夜培养。待细胞贴壁后,实验组各孔加入50 μ L RhaL-Lip/C6,对照组各孔分别加入50 μ L Lip/C6(C6浓度为 $0.06 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),37℃孵育2 h后。PBS浸洗3次后,除去未结合的脂质体。加入4%多聚甲醛溶液固定0.5 h, PBS浸洗3次。加入DAPI染色细胞核避光孵

育5 min, PBS浸洗3次,置于荧光显微镜下观察各组细胞中的荧光。或在孵育结束后使用胰蛋白酶消化并收集细胞,使用流式细胞仪检测不同孔中细胞的荧光强度。

BxPC-3/3T3、MCF-7皮下瘤模型建立 6周龄雌性裸鼠在动物房适应环境1周后,选取体重为18~20 g的裸鼠用于后续实验。将BxPC-3和3T3细胞分别进行消化,并离心收集细胞。细胞计数,调整每毫升细胞数为: BxPC-3细胞 2×10^6 个、3T3细胞为 1×10^6 个,充分混合后制备细胞悬液。使用500 μ L注射器吸取100 μ L细胞悬液,经皮下注射于小鼠前肢腋窝。按时检测肿瘤增长状态,待皮下瘤体积在 100 mm^3 左右时,即可用于后续实验。MCF-7皮下瘤模型按上述方法建立。肿瘤体积(V)根据公式(1)计算:

$$V(\text{mm}^3) = (a \times b^2) / 2 \quad (1)$$

其中, a 和 b 分别为肿瘤最宽处和最窄处。

BxPC-3/3T3、MCF-7皮下瘤模型小鼠体内靶向性评价 将BxPC-3/3T3皮下瘤模型小鼠随机分为两组,分别经尾静脉注射RhaL-Lip/DiR和Lip/DiR各100 μ L(DiR浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),分别在0.5、1、2、4、8 h等时间点,使用小动物活体成像仪观察制剂在裸鼠体内的分布情况。在8 h后,脱颈处死模型小鼠,解剖收集裸鼠的心、肝、脾、肺、肾等主要脏器和肿瘤组织,拍摄并记录荧光标记脂质体在各离体器官中的分布情况。

RhaL-Lip/PTX细胞药效评价 将 5×10^3 个BxPC-3细胞均匀接种于96孔板中,每孔200 μ L,边缘孔加入无菌PBS。将96孔板置于细胞培养箱中培养过夜,待细胞贴壁后,分别将Lip/PTX和RhaL-Lip/PTX以无血清培养基稀释后加入各孔中,每个浓度设置3个复孔,同时设置不加药的培养基的对照组,37℃、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养24 h。孵育结束后去除各孔的培养基,加入200 μ L PBS和20 μ L MTT溶液($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),并继续孵育4 h。小心吸取各孔内溶液,每孔加入150 μ L DMSO,置于37℃恒温摇床低速振荡15 min,待甲瓚结晶充分溶解后,使用酶标仪于490 nm处检测各孔的OD值,记录结果,计算细胞存活率及 IC_{50} 值。

重楼皂苷VII抗胰腺癌活性评价

细胞毒性检测 将 5×10^3 个人胰腺癌细胞BxPC-3均匀接种于96孔板中并培养至贴壁。分别加入系列浓度的PPVII和吉西他滨(gemcitabine, GEM)孵育24 h,以空白培养基孔作为对照。孵育结束后,每孔加入MTT溶液($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)孵育4 h,吸取后每孔加入150 μ L DMSO溶解,置于37℃恒温摇床低速振荡

15 min, 使用酶标仪于 490 nm 处检测各孔 OD 值, 计算细胞存活率。

细胞凋亡 使用 Annexin V 双染法检测 PPVII 对 BxPC-3 细胞凋亡的影响^[15]。将 BxPC-3 细胞均匀接种于 12 孔板中培养至贴壁, 分别加入不同浓度的 PPVII 孵育 24 h。使用胰蛋白酶消化并收集细胞, PBS 浸洗后加入 Binding buffer 重悬, 小心吹打并混合均匀。加入 Annexin V-FITC 和 Propidium Iodide, 充分混匀后室温条件下避光孵育 15 min, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

细胞周期 通过 Propidium Iodide 染色法研究 PPVII 对 BxPC-3 细胞周期的影响^[16]。将 BxPC-3 细胞均匀接种于 6 孔板中培养至贴壁, 加入不同浓度的 PPVII 溶液孵育 24 h。孵育结束后使用胰酶消化细胞, 加入 PBS 浸洗并重悬, 缓慢逐滴加入 70% 乙醇溶液, 4 °C 固定过夜。加入 PBS 浸洗后, 加入 RNase A 酶, 37 °C 孵育 30 min, 再加入 Propidium Iodide 染色液避光孵育 30 min。使用流式细胞仪检测细胞周期, 分析 PPVII 对 BxPC-3 细胞周期的影响。

PPVII-Lip 的制备 采用薄膜水化法制备 PPVII-Lip 脂质体^[7]。按药脂比为 1:30 精密称取大豆卵磷脂和 PPVII, 并充分溶解于甲醇:氯仿 (1:1) 混合溶液后, 使用旋转蒸发仪在 37 °C 条件下减压蒸发除去有机溶剂, 并加入 1 mL 5% 葡萄糖水溶液, 置于 37 °C 恒温水浴振荡器进行水化。收集水化后溶液, 使用超声波细胞粉碎仪进行超声, 600 W 超声 2 min, 透析除去未包载药物, 即得澄清透明的 PPVII-Lip。制备荧光素标记 PPVII-Lip 脂质体 (PPVII-Lip/C6, PPVII-Lip/DiR) 时, 在上述膜材料成膜前分别加入香豆素 6 或 DiR 并混匀, 按以上相同步骤制备。

PPVII-Lip 的表征

粒径及电位 使用马尔文激光粒度仪对脂质体的粒径大小、分散性、zeta 电位进行表征。使用 HPLC 测定脂质体的载药量, 流动相为乙腈-水 (40:60) (v/v), 检测波长 203 nm。载药量及包封率分别按公式 (2)、(3) 计算:

$$\text{载药量 (\%)} = \frac{\text{透析后脂质体含药量/药物及辅料总量} \times 100\%}{\text{药物及辅料总量}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{包封率 (\%)} = \frac{\text{透析后脂质体含药量/药物投料量} \times 100\%}{\text{药物投料量}} \times 100\% \quad (3)$$

体外释放 吸取 1 mL PPVII-Lip 脂质体, 装入截留分子量为 8 000~14 000 Da 的透析袋中, 使用 50 mL 含 0.1% Tween 80 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 作为释放介质, 置于 37 °C 恒温振荡器中缓慢振荡。分别于 15 min、0.5、1、2、4、6、12、24 h 等时间点各吸取 1 mL 释

放介质, 同时补充 1 mL 新鲜释放介质。使用 HPLC 测定不同时间点的释放介质中 PPVII 的含量, 计算累积释放率。

差示扫描量热 (differential scanning calorimetry, DSC) 通过差示扫描量热仪研究 PPVII-Lip 热力学变化^[17], 每个样品 15 mg, 扫描速度为 5 °C·min⁻¹, 每个样品重复 3 次以确保重复性。所有样品完全干燥后, 分别转移至预称重的铝盘中, 氮气保护下, 温度范围设置为 25~300 °C, 使用 DSC 200PC 软件绘制并分析曲线。

蛋白冠吸附实验 将浓度相同的 Lip 和 PPVII-Lip 与血清按 1:1 的比例混合, 37 °C 孵育 2 h。12 000 r·min⁻¹ 高速离心 20 min 去上清, 纯水洗 3 次, 保留沉淀。测定蛋白含量后, 将样品按 4:1 (v/v) 与 SDS 蛋白上样缓冲液 (5×) 混合, 置于沸水中加热 10 min, 使蛋白充分变性。分别取等量样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 10% 浓缩胶电泳电压为 80 V, 电泳 30 min 后, 10% 分离胶电泳电压为 120 V, 至溴酚蓝到达分离胶底部后停止电压。考马斯亮蓝染 1 h 后, 一级水洗至背景无色, 暗室显影拍照。

PPVII-Lip 体内外靶向性考察

体外靶向性评价 分别将 BxPC-3 细胞按每孔 1×10⁴ 个细胞均匀接种于 48 孔板中培养过夜。待细胞贴壁后, 分别加入 Lip/C6、PPVII-Lip/C6, 于 37 °C 下孵育 2 h。孵育结束后, PBS 漂洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液固定 0.5 h 后用 DAPI 染色细胞核, 使用荧光显微镜观察摄取情况; 或在孵育结束后使用胰酶消化并收集细胞, 流式细胞仪检测不同孔中细胞的荧光量。

体内靶向性评价 将人胰腺癌 (BxPC-3/3T3) 皮下瘤模型小鼠随机分为两组, 分别尾静脉注射 100 μL PPVII-Lip/DiR 或 Lip/DiR (DiR 浓度为 0.1 mol·L⁻¹), 于 0.5、1、2、4 和 8 h, 使用小动物活体成像仪观察荧光在裸鼠体内的分布情况。在 8 h 后, 解剖收集裸鼠的心、肝、脾、肺、肾和肿瘤, 记录荧光在离体器官中的分布情况。

PPVII-Lip 渗透性考察

3D 肿瘤球实验 将 BxPC-3 细胞和 3T3 细胞分别以 1×10⁶ 个的量接种于低吸附的 96 孔板中, 低速离心, 使细胞聚集于孔板底部, 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 每隔 2 天换液 1 次, 观察肿瘤球的形成及其大小。待肿瘤球长至 300 μm 以上, 即可用于后续试验。将等量的 PPVII-Lip/C6、Lip/C6 小心加入到肿瘤球孔中, 37 °C 孵育 1、2、4、8、12、24 h 后, PBS 小心洗去上清液, 使用共聚焦荧光显微镜观察不同时间点荧光渗透深度, Z 轴固定在 150 μm。

肿瘤免疫荧光切片 分别将制备的 PPVII-Lip/

RhB、Lip/RhB 经尾静脉注射入 BxPC-3/3T3 皮下瘤模型裸鼠体内,并以游离的 RhB 为对照。4 h 后将小鼠脱颈处死并取出肿瘤。冰冻切片制成 6 mm 的切片,使用荧光共聚焦显微镜下观察各组荧光在肿瘤组织中的渗透深度。

PPVII-Lip 抗胰腺癌体内药效评价及安全性考察

PPVII-Lip 细胞药效评价 将 BxPC-3 细胞按每个孔 5×10^3 个细胞均匀接种于 96 孔板中,置于细胞培养箱中过夜培养。PPVII-Lip 和 Lip/GEM 细胞毒性使用 MTT 法测定^[18]。使用无血清培养基对 PPIII-Lip 和 Lip/GEM 进行等倍稀释后加入各孔中,药物终浓度均为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,每个浓度设置 3 个复孔,同时设置不加药的对照组。37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。除去每孔中加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL ,继续培养 4 h 后,小心吸出孔内培养液。每孔加入 150 μL DMSO,置于 37 °C 恒温摇床低速振荡 15 min,待结晶充分溶解后,使用酶标仪于 490 nm 处检测各孔的 OD 值,记录结果,计算细胞存活率及 IC₅₀ 值。

PPVII-Lip 体内抗胰腺癌药效及安全性评价 当 BxPC-3/3T3 皮下瘤模型小鼠肿瘤体积长至 100 mm³ 时,随机将模型裸鼠分为 3 组,每只模型裸鼠通过尾静脉每 3 天给药 1 次,共给药 6 次。给药剂量:对照组, PBS, 每只 0.2 mL; Lip/GEM 组, GEM 10 mg·kg⁻¹; PPIII-Lip 组, PPIII 10 mg·kg⁻¹。每隔 3 天测量实体瘤大小,称量裸鼠的体重变化,记录并计算肿瘤体积。治疗结束后,用全自动生化分析仪分别检测各组模型小鼠血清中天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、尿素 (UREA)、

丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和肌酐 (CREA) 的含量。

统计学分析 使用 ANOVA 进行统计分析,定量数据均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

结果与讨论

1 RhaL-Lip 的表征

1.1 RhaL-Lip 粒径及电位 使用马尔文激光粒度仪测试各组脂质体的粒径 (size) 及 zeta 电位并记录数据,结果如表 1 所示。所制得的脂质体平均粒径均在 80 nm,分散系数在 0.2 左右,分布均一。

1.2 RhaL-Lip/PTX 体外释放情况及稳定性考察 采用透析法测定负载紫杉醇的 Lip/PTX 和 RhaL-Lip/PTX 脂质体体外释放情况,测定不同时间点释放介质内 PTX 的浓度。结果如图 1A 所示,RhaL-Lip/PTX 表现出持续而缓慢的 PTX 释放,且未发生 PTX 突释现象,释放曲线平滑,24 h 释放率可达 70%,此后趋于平缓;通过与 Lip/PTX 脂质体释放曲线比较,表明鼠李糖脂表面修饰不影响紫杉醇体外释放性能和稳定性。此外,通过图 1B 可知,3 天内 RhaL-Lip/PTX 脂质体粒径无明显变化,证明该脂质体的稳定性较好。

1.3 鼠李糖荧光探针与 BxPC-3、MCF-7 细胞的特异性结合 由于目前没有市售的鼠李糖受体相应抗体,按文献^[11]方法,利用生物素-亲和素使 QD 标记鼠李糖,作为探针考察 BxPC-3 细胞和 MCF-7 细胞表面 RBL 受体的表达情况。各细胞与鼠李糖荧光探针在 37 °C 孵育 0.5 h 后,使用共聚焦荧光显微镜下观察,结

Table 1 Size, PDI and zeta potential of different liposomes. $n = 3, \bar{x} \pm s$. PDI: Polydispersity index

Liposomes	Size/nm	PDI	Zeta potential/mV	Entrapment efficiency/%
RhaL-Lip	81.16 \pm 1.24	0.23 \pm 0.01	-8.31 \pm 0.25	98.24 \pm 1.06
RhaL-Lip/PTX	79.92 \pm 2.48	0.21 \pm 0.02	-11.53 \pm 0.12	84.13 \pm 4.85
Lip/PTX	99.45 \pm 1.39	0.18 \pm 0.02	-13.53 \pm 0.34	83.79 \pm 5.28
RhaL-Lip/C6	84.23 \pm 1.73	0.25 \pm 0.01	-12.82 \pm 0.21	98.78 \pm 1.25
Lip/C6	85.74 \pm 1.46	0.19 \pm 0.01	-11.53 \pm 0.37	98.83 \pm 1.77
RhaL-Lip/DiR	85.85 \pm 2.04	0.24 \pm 0.02	-15.42 \pm 0.28	93.72 \pm 1.14
Lip/DiR	86.82 \pm 1.63	0.21 \pm 0.01	-14.74 \pm 0.19	92.58 \pm 1.08

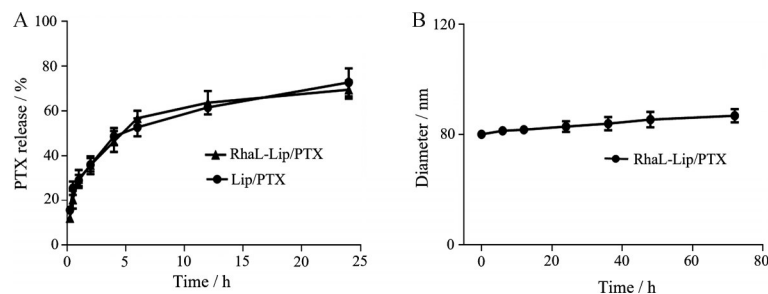


Figure 1 Investigation of *in vitro* stability and release. A: *In vitro* PTX cumulative profiles of RhaL-Lip/PTX and Lip/PTX; B: The stability of RhaL-Lip/PTX. $n = 3, \bar{x} \pm s$. PTX: Paclitaxel; RhaL-Lip: Rhamnolipid-modified liposomes

果如图2A所示。BxPC-3细胞表面有明显的红色荧光,而MCF-7表面几乎无荧光,由此推测BxPC-3细胞表面有RBL受体的表达,而MCF-7细胞表面鼠李糖受体表达较弱。

1.4 竞争性抑制实验 加入游离的鼠李糖竞争性抑制探针与细胞的结合,结果进一步证明了鼠李糖在细胞与探针结合中发挥的作用。结果如图2B所示,预孵育鼠李糖后,细胞表面结合的荧光探针量明显减少,表现出游离鼠李糖对探针与细胞结合有较强的竞争性抑制作用。

近年来,以葡萄糖为代表的糖基靶向递药策略已取得了一定的研究进展,但由于人体内天然存在大量的葡萄糖,可能存在内源性葡萄糖的竞争性抑制作用,从而降低药物与细胞的结合作用^[7]。鼠李糖并未被发现天然存在于人体中,因此以鼠李糖为靶向基团的递药系统不存在内源性竞争抑制作用。为了比较两种靶向递药策略,本文进一步探究了葡萄糖的竞争性抑制作用。如图3所示,加入游离的葡萄糖竞争性抑制探针与细胞结合后,BxPC-3细胞和MCF-7细胞表面的荧光强度均明显低于未做处理的细胞。

1.5 入胞机制考察 研究纳米递药系统的细胞摄取机制,有助于从细胞层次上探索药物的作用机制,为更加安全有效地用药提供重要的依据。目前多数纳米药

物进入细胞的途径是内吞^[9]。通过加入多种不同的细胞内吞途径的抑制剂,阻断特定的内吞途径以确定纳米药物的入胞途径。实验结果如图4所示,RhaL-Lip/C6主要通过网格蛋白、小窝蛋白和脂筏介导的内吞途径进入细胞。

1.6 不同细胞体外摄取脂质体的定性评价 分别将Lip/C6和RhaL-Lip/C6与BxPC-3细胞、MCF-7细胞、BGC-823细胞、3T3细胞孵育2h后,用荧光倒置显微镜定性评价。结果如图5A~D所示。在相同时间内,BxPC-3细胞和3T3细胞对RhaL-Lip/C6的摄取量明显多于对照组,且BxPC-3细胞的差异更显著,表现出更高效的摄取率;而在MCF-7细胞和BGC-823细胞中,荧光量没有显著差异。以上实验结果表明,RhaL-Lip针对BxPC-3细胞具有良好体外肿瘤靶向能力。

1.7 BxPC-3和MCF-7体外摄取脂质体的定量评价 分别将Lip/C6和RhaL-Lip/C6与BxPC-3细胞或MCF-7细胞孵育2h后,用流式细胞仪定量检测荧光信号,结果如图5E、F所示。在BxPC-3细胞中,RhaL-Lip/C6组的荧光信号明显强于对照组,表现出较强的靶向性;而在MCF-7细胞中,两组细胞的荧光量没有显著差异。实验结果表明,鼠李糖可促进BxPC-3细胞对RhaL-Lip的靶向摄取作用。

1.8 RhaL-Lip体内靶向性评价 在预先设定好的时

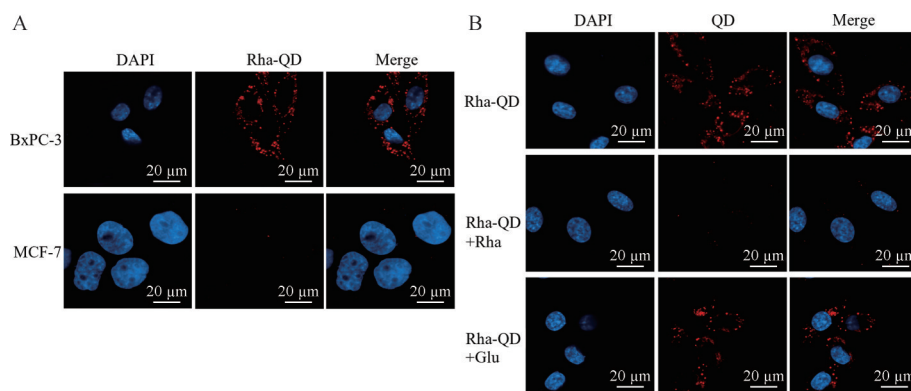


Figure 2 Competitive inhibition experiments. A: Confocal observation of rhamnose-QD on various cancer cell lines (BxPC-3 and MCF-7); B: Confocal microscopic view of rhamnose-QD localized on the BxPC-3 cell surface. The binding of rhamnose-QD was blocked by rhamnose. Scale bar, 20 μm

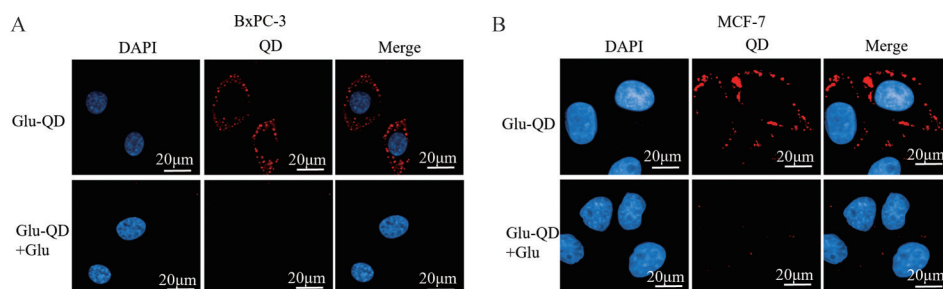


Figure 3 Confocal microscopic view of endogenous glucose competitive inhibition in BxPC-3 (A) and MCF-7 (B) cells. Scale bar, 20 μm

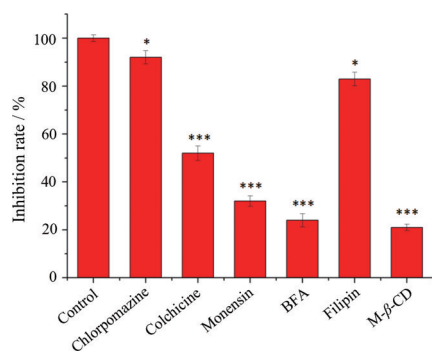


Figure 4 Quantitative cellular uptake of RhaL-Lip in BxPC-3 cells pre-incubation with different endocytosis inhibitors. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group

间点观察荷瘤裸鼠体内的荧光分布情况, 在 BxPC-3/3T3 皮下瘤模型中 (图 6A), 对照组肿瘤部位因 EPR 效应有少量的荧光蓄积, 而 RhaL-Lip/DiR 组的裸鼠肿瘤部位蓄积量明显更多, 表明经鼠李糖脂修饰后, RhaL-Lip 对 BxPC-3/3T3 皮下瘤的蓄积量显著增加, 表现出良好的靶向性; 而在 MCF-7 皮下瘤模型中 (图 6B), RhaL-Lip 则并未表现出针对 MCF-7 皮下瘤组织良好的肿瘤靶向能力, 其原因可能是 MCF-7 表面鼠李糖结合凝集素表达较低, 无法有效介导 RhaL-Lip 特异性结合。

1.9 体外药效评价 通过 MTT 法检测结果如图 7 所示, Lip/PTX 和 RhaL-Lip/PTX 对 BxPC-3 细胞生长均有抑制作用, 并存在量效关系。在相同 PTX 浓度下, Lip/PTX 组的 IC_{50} 为 $40.46 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, RhaL-Lip/PTX 组的 IC_{50} 为 $7.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, RhaL 显著增强了 PTX 对 BxPC-3 的抑制作用, 表明以鼠李糖为靶向分子的靶向递药系统可提高对 BxPC-3 肿瘤细胞的体外药效。

2 PPVII 抗胰腺癌活性研究

2.1 细胞毒性检测 MTT 法研究 PPVII 对 BxPC-3 细胞增殖的影响, 结果如图 8 所示。PPVII 对 BxPC-3 细胞有较强的抑制能力, 且 PPVII 抑制效果随药物浓度增高而增强, 存在量效关系。经计算 IC_{50} 为 $0.23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而胰腺癌临床一线化疗药物吉西他滨 IC_{50} 大于 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 相同剂量条件下, 说明 PPVII 具有更高的抗胰腺癌活性。

2.2 PPVII 促进 BxPC-3 细胞凋亡 将 Annexin-V-FITC 与 PI 联合使用, 用流式细胞仪检测即能反映出细胞不同的凋亡时期。流式结果表明, 与 PPVII 作用后, BxPC-3 细胞的凋亡率显著增加, 且呈现药物浓度依赖性。对照组细胞 24 h 后凋亡率为 0.22%, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24 h 后, 细胞凋亡率为 8.6%; 5 和 $7.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的

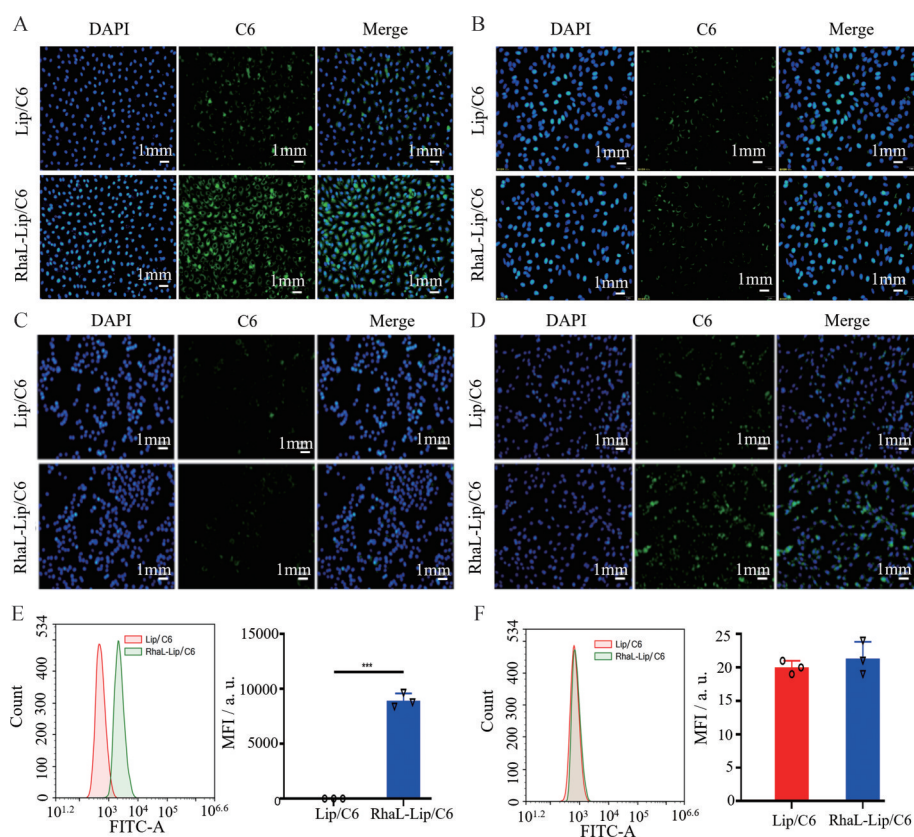


Figure 5 Different cancer cell lines cell uptake of RhaL-Lip by fluorescence microscope. A: BxPC-3 cells; B: MCF-7 cells; C: BGC-823 cells; D: 3T3 cells. Scale bar, 1 mm. Flow cytometry analysis and quantification of cellular uptake by BxPC-3 cells (E), MCF-7 cells (F), and quantification of mean fluorescence intensity of the histograms. MFI: Mean fluorescence intensity. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$

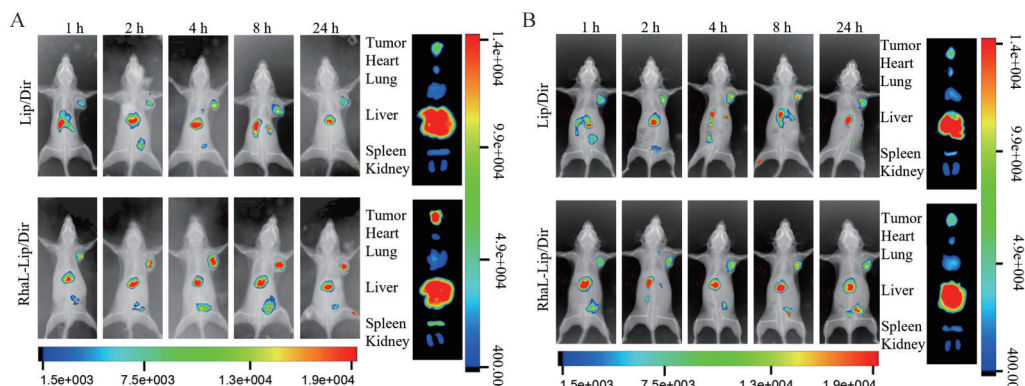


Figure 6 *In vivo* fluorescence imaging of BxPC-3 tumor-bearing mice (A), MCF-7 tumor-bearing mice (B) after treatment with RhaL-Lip/DiR and Lip/DiR. DiR: 1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindotricarbocyaïne iodide

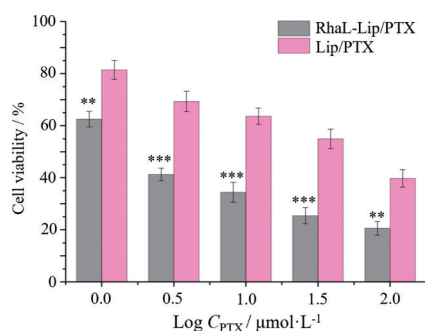


Figure 7 *In vitro* cytotoxicity of RhaL-Lip/PTX and Lip/PTX. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Lip/PTX group

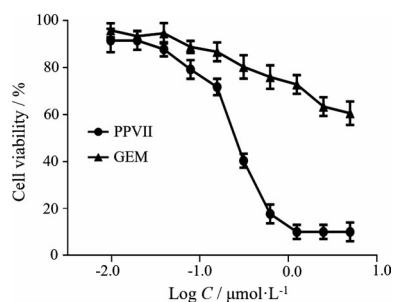


Figure 8 *In vitro* cytotoxicity of PPVII and GEM. $n = 3, \bar{x} \pm s$. PPVII: Polyphyllin VII; GEM: Gemcitabine

PPVII 分别作用 24 h 后, BxPC-3 细胞的凋亡率分别为 20.13% 和 62.32%, 均显著高于对照组 (图 9A)。实验结果表明, PPVII 可有效促进 BxPC-3 细胞。

2.3 PPVII 阻滞 BxPC-3 细胞周期 收集不同浓度 PPVII 作用后的细胞并染色, 流式细胞仪检测结果如图 9B 所示。由结果可以得知, PPVII 作用 24 h 后, BxPC-3 细胞的周期发生了明显的变化。加入等量 PBS 的对照组中, 细胞周期主要分布在 G0/G1 期, 占 78%, G2/M 期占 6.29%, S 期占 15.51%。加入 PPVII 作用的实验组细胞, 随着药物浓度的增加, 细胞 G0/G1 期所占比例下降, G2/M 期所占比率略微上涨, S 期所占

比率明显上升。随着药物浓度的增加, G0/G1 期比率依次为 73.48%、71.93%、60.32%、50.32%, G2/M 期的比率依次为 6.88%、6.68%、10.57%、13.95%, S 期比率依次为 19.64%、21.38%、29.11%、35.72%。表明 PPVII 能抑制细胞周期, 使细胞周期阻滞于 S 期, 且抑制强度呈浓度依赖性。

3 PPVII-Lip 的表征

3.1 理化性质和释放行为表征 激光粒度仪测得各组脂质体的粒径及 zeta 电位并记录数据, 结果如图 10A 所示。结果表明, PPVII-Lip 平均粒径为 78 nm, 分散系数为 0.214, 且都呈单峰, 分布均一。PPVII-Lip 脂质体包封率为 $95.27\% \pm 1.36\%$, 载药量为 $8.69\% \pm 2.13\%$ 。

使用 DSC 表征脂质体的热力学转变, 图 10B 显示了 PPVII-Lip 或 PPVII 或两种原材料的物理混合的 DSC。研究发现物理混合的熔点在 101 °C 左右, 单独的重楼皂苷 VII 显示约 52 和 266 °C 的峰, 而以上特征峰在 PPVII-Lip 中并没有观察到, 以上实验结果表明了重楼皂苷 VII 成功插入到脂质体结构之中。

通过测定 24 h 内载药脂质体 PPVII-Lip 中 PPVII 的释放, 表征 PPVII-Lip 缓慢释放性质。结果如图 10C 所示, PPVII 原料药在前 4 h 累积释放率高于 95%, 而 PPVII-Lip 释放速率缓慢且稳定, 无突释现象发生, 释放曲线平滑, 表明 PPVII-Lip 具有缓释性能且稳定性良好。

蛋白冠是指递药系统进入生物环境如血清后, 其表面会吸附一层或多层蛋白所组成的结构, 称为蛋白冠^[20]。然而, 递药系统表面性质发生变化时, 所吸附的蛋白含量或蛋白的组分将发生变化^[21]。实验结果如图 10D 所示, PPVII-Lip 组的蛋白条带明显比 Lip 组浅, 表明 PPVII-Lip 吸附的蛋白量显著少于普通 Lip, 这个结果表明, 重楼皂苷的糖基暴露于脂质体外侧, 可有效减少 PPVII-Lip 与血清中的蛋白的非特异性结合。

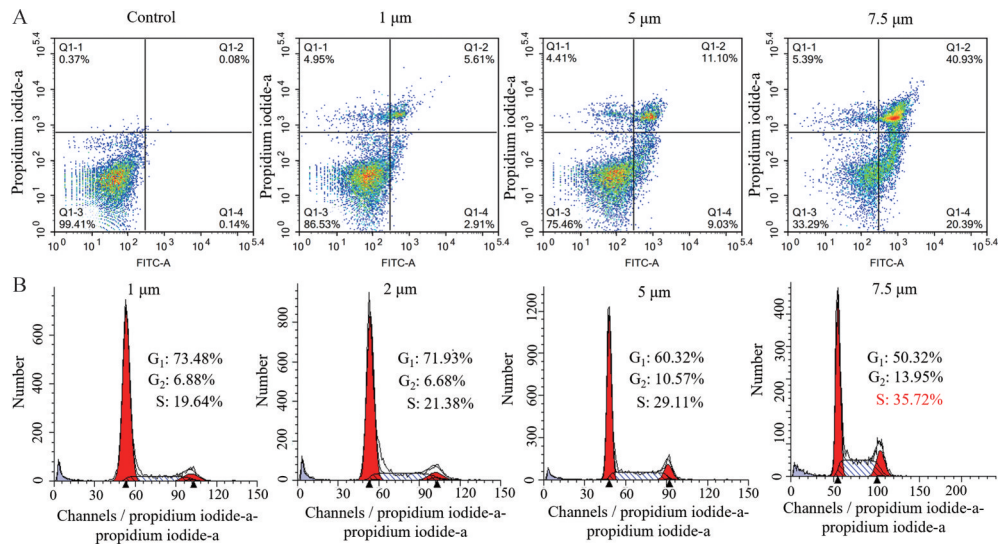


Figure 9 Effects of PPVII on the BxPC-3 cells cycle and apoptosis. A: Flow cytometric analysis of PPVII induced cell apoptosis; B: PPVII induced cell cycle changes in BxPC-3 cells

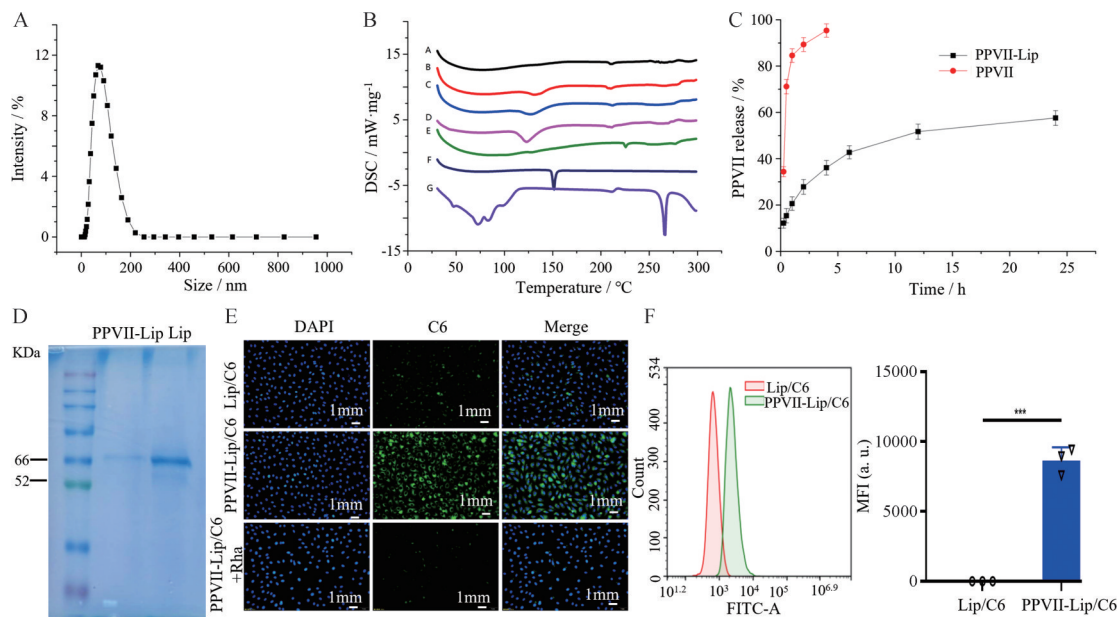


Figure 10 Characterization of the physicochemical properties of PPVII-Lip. A: Size distribution of PPVII-Lip; B: DSC scans during the interactions of PPVII and lipid material; C: *In vitro* PTX cumulative profiles of PPVII-Lip; D: Separation of protein corona by SDS-PAGE; E: BxPC-3 cell uptake of PPVII-Lip by fluorescence microscope; F: Flow cytometry, and quantification of mean fluorescence intensity of the histograms. Scale bar, 1 mm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$. DSC: Differential scanning calorimetry

3.2 BxPC-3 细胞体外摄取 PPVII-Lip 的定性及定量评价 使用荧光倒置显微镜定性观察 BxPC-3 细胞对 Lip/C6 和 PPVII-Lip/C6 摄取情况, 结果如图 10E 所示。BxPC-3 细胞对 PPVII-Lip/C6 的摄取量明显多于对照组, 表现出更高效的摄取率。表明 PPVII-Lip 针对 BxPC-3 细胞具有体外靶向能力。此外, 与鼠李糖预孵育后, 细胞结合的荧光探针量明显减少, 显示出游离鼠李糖对 PPVII 脂质体与细胞结合有较强的竞争性抑制作用。

使用流式细胞仪定量检测 BxPC-3 细胞对 Lip/C6 和 PPVII-Lip/C6 摄取情况, 结果如图 10F 所示。针对 BxPC-3 细胞, PPVII-Lip/C6 组的荧光信号明显强于对照组, 表现出较强的 BxPC-3 细胞靶向性, 且与定性评价结果相吻合。

3.3 PPVII-Lip 体内靶向性考察 荧光活体成像实验结果 (图 11A) 显示, 与对照组相比, PPVII-Lip/DiR 组的模型裸鼠肿瘤部位有更强的荧光信号, PPVII-Lip 在肿瘤部位的蓄积量显著增多, 表明 PPVII-Lip 对 BxPC-3

皮下瘤具有显著的体内靶向功能。

3.4 PPVII-Lip 渗透性考察 由于胰腺癌肿瘤体富含大量的肿瘤相关成纤维细胞, 导致胰腺癌渗透性较差, 化疗药物难以进入肿瘤内部, 最终疗效降低^[22]。为了探讨 PPVII-Lip 对胰腺癌肿瘤的渗透性, 本研究通过 3D 肿瘤球模型验证了 PPVII-Lip 胰腺癌的渗透性。如图 11B 所示, PPVII-Lip 对 BxPC-3/3T3 肿瘤球具有更好的渗透性。

进一步利用 BxPC-3 和 3T3 两种细胞混合肿瘤的方式, 模拟其肿瘤内环境, 并对其进行了渗透性评价。PPVII-Lip 的体内渗透性评价结果如图 11C 所示, 肿瘤边缘至瘤体中心方向 500 μm 处画虚线作为参照,

PPVII-Lip/RhB 组的荧光渗透深度明显高于 Lip/RhB 组, 表现出更优的肿瘤组织渗透能力。以上实验结果表明, 相较于无靶向基团脂质体药物, PPVII-Lip 能实现 BxPC-3 肿瘤组织的深层递送, 有望在体内治疗中表现出更佳的治疗效果。

4 PPVII-Lip 体内外药效及安全性评价

4.1 体外药效评价 通过 MTT 法检测结果如图 12A 所示, PPVII-Lip 和 Lip/GEM 对 BxPC-3 细胞均有生长抑制作用, 并具有量效关系。经计算, PPVII-Lip 组 IC₅₀ 为 0.293 μmol·L⁻¹, Lip/GEM 组的 IC₅₀ 大于 5 μmol·L⁻¹。相同药物浓度下, PPVII-Lip 对 BxPC-3 细胞表现出更强的抑制能力。

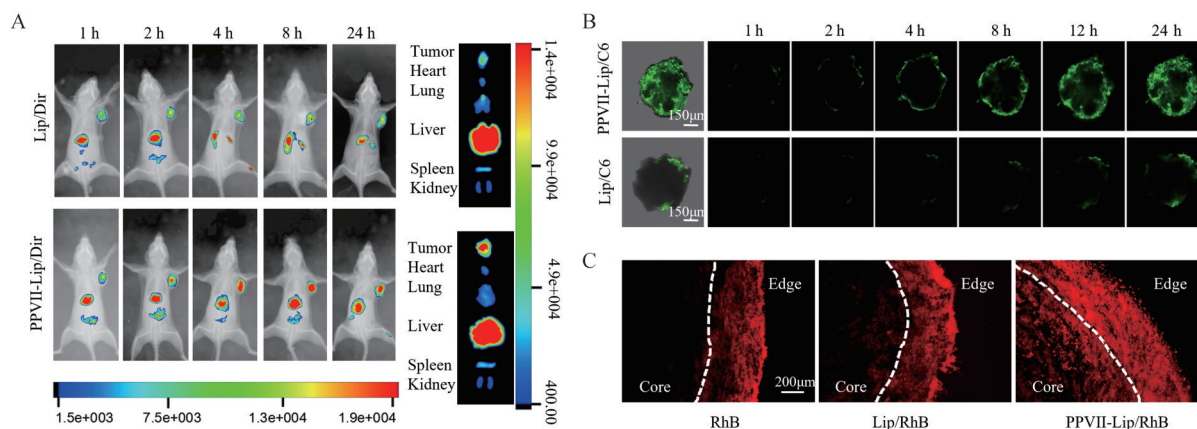


Figure 11 Tumor targeting and penetration of PPVII-Lip. A: *In vivo* fluorescence imaging of BxPC-3 tumor-bearing mice after treatment with PPVII-Lip/DiR and Lip/DiR; B: *In vitro* penetration efficiency of PPVII-Lip/C6 and Lip/C6 into tumor spheroids. Scale bar, 100 μm, Z-axis depth 150 μm; C: Evaluation of the tumour permeability of PPVII-Lip. Scale bar, 200 μm

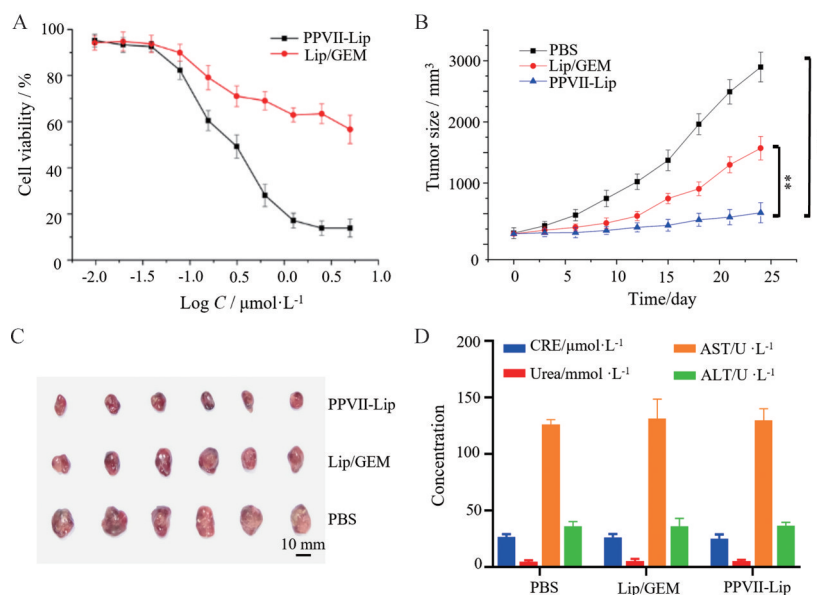


Figure 12 Efficacy and safety assessment of PPVII-Lip. A: *In vitro* cytotoxicity of PPVII-Lip and Lip/GEM; B: Tumor growth curves of PPVII-Lip, Lip/GEM and PBS; C: Photographs of tumors dissected on the day 24. Scale bar, 10 mm; D: Levels of serum biochemical indicators of mice after administration. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

4.2 体内药效评价 根据记录的体内药效数据, 绘制 PPVII-Lip 抑瘤曲线。结果如图 12B、C 所示。PPVII-Lip 治疗组的 BxPC-3/3T3 皮下瘤裸鼠的肿瘤平均体积均小于 Lip/GEM 治疗组, 表明 PPVII-Lip 对胰腺癌实体瘤明显的抑制作用。

4.3 安全性评价 PPVII-Lip 组各项指标均在正常范围内, 结果如图 12D 所示, 与生理盐水组没有显著差异, 说明该制剂对动物肝功能、肾功能无明显损伤, 安全性良好。

结论

本课题选择对 BxPC-3 胰腺癌细胞具有特异性识别能力的鼠李糖作为靶向基团, 成功构建了针对胰腺癌具有良好主动靶向功能的脂质体递药系统。采用鼠李糖脂作为靶向材料并构建鼠李糖脂脂质体, 探索鼠李糖介导的递药系统对人胰腺癌细胞 BxPC-3 靶向识别能力。将紫杉醇包载于该脂质体中, 鼠李糖脂脂质体显著提高了紫杉醇对人胰腺癌细胞 BxPC-3 的抑制能力。本研究还发现与鼠李糖脂结构类似的天然抗肿瘤药物 PPVII 对 BxPC-3 细胞具有靶向性和抗肿瘤活性。因此, 进一步采用 PPVII 作为靶向材料和抗肿瘤活性物质, 成功构建了 PPVII 脂质体。通过对该递药系统进行体内、外靶向性和体内、外药效评价, 发现其不仅表现出了针对胰腺癌的主动靶向能力。与现有临床一线抗胰腺癌药物相比, 还可以有效提高了抗肿瘤药物对胰腺癌细胞的抑制能力和渗透能力。基于鼠李糖活性结构构建胰腺癌靶向递药系统, 可有效规避内源性葡萄糖对糖基修饰递药载体所形成的竞争性抑制, 可有效提高药物对胰腺癌的靶向选择性和药物疗效。该策略为胰腺癌的诊断和靶向治疗提供了一种新的思路和方法。

作者贡献: 高飞燕负责实验研究过程并撰写论文; 张焱和李翀提出实验思路、设计研究方案并修改论文; 刘鑫龙和彭珊协助进行实验数据采集与分析; 所有作者均阅读并参与修改了本论文。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- Guo JS, Li JJ, Wang ZH, et al. Dual hypoxia-responsive supramolecular complex for cancer target therapy [J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 5634.
- Tuveson DA, Neoptolemos JP. Understanding metastasis in pancreatic cancer: a call for new clinical approaches [J]. *Cell*, 2012, 148: 21-23.
- Khare V, Alam N, Saneja A, et al. Targeted drug delivery systems for pancreatic cancer [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10: 3462-3482.
- Xia JX, Ma SJ, Zhu X, et al. Versatile ginsenoside Rg3 liposomes inhibit tumor metastasis by capturing circulating tumor cells and destroying metastatic niches [J]. *Sci Adv*, 2022, 8: eabj1262.
- Kawakami S, Hashida M. Glycosylation-mediated targeting of carriers [J]. *J Control Release*, 2014, 190: 542-555.
- Li J, Tang W, Yang Y, et al. A programmed cell-mimicking nanoparticle driven by potato alkaloid for targeted cancer chemoimmunotherapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10: e2100311.
- Wang X, Zheng WW, Shen Q, et al. Identification and construction of a novel biomimetic delivery system of paclitaxel and its targeting therapy for cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 33.
- Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications [J]. *Intern Med J*, 2005, 35: 548-555.
- Faury G, Ruszova E, Molinari J, et al. The α -l-rhamnose recognizing lectin site of human dermal fibroblasts functions as a signal transducer: modulation of Ca^{2+} fluxes and gene expression [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780: 1388-1394.
- Faury G, Molinari J, Rusova E, et al. Receptors and aging: structural selectivity of the rhamnose-receptor on fibroblasts as shown by Ca^{2+} -mobilization and gene-expression profiles [J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2011, 53: 106-112.
- Wang YY, Gao J, Gu GF, et al. *In situ* RBL receptor visualization and its mediated anticancer activity for solasodine rhamnosides [J]. *Chembiochem*, 2011, 12: 2418-2420.
- Yuan RR, Kay A, Berg WJ, et al. Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2009, 2: 45.
- Zhang J, Zhu X, Jin Y, et al. Mechanism study of cellular uptake and tight junction opening mediated by goblet cell-specific trimethyl chitosan nanoparticles [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11: 1520-1532.
- Liu YY, Ran R, Chen JT, et al. Paclitaxel loaded liposomes decorated with a multifunctional tandem peptide for glioma targeting [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 4835-4847.
- Li JQ, Zhang XG, Zhang JT. Study on the anti-apoptotic mechanism of ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1997, 32: 406-410.
- Liang C, Zhou Y, Fan CC, et al. Inhibitory effect of chikusetsusaponin IVa on proliferation of triple negative breast cancer cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 2677-2684.
- Wei XH, Cohen R, Barenholz Y. Insights into composition/structure/function relationships of Doxil® gained from "high-sensitivity" differential scanning calorimetry [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 104: 260-270.

- [18] Lin MT, Tang SL, Zhang C, et al. Euphorbia factor L2 induces apoptosis in A549 cells through the mitochondrial pathway [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7: 59-64.
- [19] Manzanares D, Ceña V. Endocytosis: the nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12: 371.
- [20] Salvati A, Pitek AS, Monopoli MP, et al. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface [J]. *Nat Nanotechnol*, 2013, 8: 137-143.
- [21] Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, et al. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials [J]. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7: 779-786.
- [22] Lee BY, Hogg EKJ, Below CR, et al. Heterocellular OSM-OSMR signalling reprograms fibroblasts to promote pancreatic cancer growth and metastasis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 7336.