肿瘤微环境双响应可变形纳米粒的制备及其用于乳腺癌治疗的研究

龚博锴, 肖 岚, 邓珙楠, 张锺权, 贾文锋, 童 凡, 高会乐*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 单一的纳米疗法在乳腺癌治疗中往往受纳米递送效率、肿瘤微环境 (tumour microenvironment, TME) 等因素制约, 导致患者未能展现出令人满意的生存质量与生存期。为增加纳米药物在乳腺癌组织内的蓄积量, 本文设计了一种可在肿瘤微环境中响应变形的纳米粒, 并基于此开发了一种光动力疗法−免疫疗法−化疗联合治疗策略。该体系由两条长短不一的两亲性多嵌段分子链组成球状结构, 内部疏水空腔用于包载化疗药物紫杉醇 (paclitaxel, PTX)。纳米粒在肿瘤微环境中受基质金属蛋白酶-2 (matrix metallopeptidase 2, MMP-2) 与活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 作用发生形态转化, 增加光敏药物焦脱镁叶绿酸a (pyropheophorbide a, Ppa) 在肿瘤内部的滞留性, 同时释放PTX与程序性细胞死亡−配体1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) 抑制剂dPPA。在近红外光照射下, Ppa产生ROS, 直接杀伤肿瘤细胞, 激活体内免疫响应, 同时促进纳米粒的ROS响应。本课题合成并表征了PTX@DTPD-PPP, 通过摄取实验、光响应ROS、细胞毒性实验和细胞迁移侵袭实验等, 评价双响应制剂的药物递送能力与治疗效果。研究结果表明, PTX@DTPD-PPP粒径均一稳定且表面带负电荷 (水合粒径 = 144 ± 1.3 nm, zeta电位 = −6.8 ± 0.9 mV), 在体外TME模拟环境下可在4 h以内实现响应变形。在肿瘤细胞蓄积量与细胞毒性相较于游离光敏药物Ppa和化疗药物PTX以及其他制剂组都明显增加, 为后续动物研究打下了坚实的基础。

关键词: 可形变; MMP-响应; ROS响应; 乳腺癌; 光动力疗法; 免疫疗法

中图分类号: R943 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)08-2615-11

The preparation and evaluation of dual-tumor microenvironment-responsive transformable nanoscale drug delivery system for breast cancer combination therapy

GONG Bo-kai, XIAO Lan, DENG Gong-nan, ZHANG Zhong-quan, JIA Wen-feng, TONG Fan, GAO Hui-le*

(*West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China*)

Abstract: Ranked second and fourth respectively in incidence rate and mortality rate among various cancers, breast cancer is characterized by strong invasion, high recurrence, poor prognosis and a lack of effective treatment, rendering the quality of life and the survival time of patients unsatisfactory. Herein, we designed a dual-response shape-transformable nanomicelle consisted of two amphipathy chains of different length, within which the chemotherapeutic agent paclitaxel (PTX) is encapsulated in the hydrophobic cavity. Based on it a combined therapy of photodynamic therapy, immunotherapy and chemotherapy was developed to augment the accumulation of therapeutic drugs in breast cancer tissues and treating efficacy. Entered in tumour microenvironment (TME), the shape transformation of micelles would be triggered by reactive oxygen species (ROS) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), so as to increase the retention of the photosensitizer pyropheophorbide-a (Ppa) in tumours and release PTX and

收稿日期: 2025-06-22; 修回日期: 2025-07-13.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173762).
*通讯作者 E-mail: gaohuile@scu.edu.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0703

D-type programmed cell death ligand 1 (PD-L1) peptide antagonist (dPPA) concurrently, thus addressing the incompatibility of long blood circulation time, tumor penetration and retention. Under the irradiation of near infrared light, ROS produced by Ppa brought about stronger killing of cancer cells, activation of host immunity and promotion of ROS response. The dual-responsive group PTX@DTPD-PPP, along with two single-responsive groups PTX@DTPD-PRP and PTX@DPD-PPP and non-responsive group PTX@DPD-PRP were initially synthesized and characterized. Through cellular uptake experiment, light-responsive ROS generation experiment, cytotoxicity test, migration and invasion test and so forth, we proved the enhancement in both drug delivery and treating effect of dual-responsive formation. These findings demonstrate that PTX@DTPD-PPP is fulfilled with an uniform particle size (144 ± 1.3 nm) and a negative surface (−6.8 ± 0.9 mV), as well as the transformation responsiveness in 4 h within *in vitro* experiments. Both the drug accumulation and cellular toxicity of dual-responsive group are prominently increased in contrast with free Ppa, free PTX as well as other formations, laying a foundation for the sequent *in-vivo* studies.

Key words: shape transformation; MMP-2 response; ROS response; breast cancer; photodynamic therapy; immunotherapy

肿瘤已成为全球人类健康的主要威胁, 根据世界卫生组织国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 发布的2022年全球最新癌症负担数据, 2022年全球新发癌症1 996万例, 其中, 乳腺癌占比高达11.5%, 位居第二[1]。尽管早期乳腺癌患者5年生存率超90%[2], 但受肿瘤异质性、免疫抑制性肿瘤微环境 (tumour microenvironment, TME) 等因素影响, 以化学疗法、放射疗法为代表的传统肿瘤治疗手段对晚期乳腺癌患者的治疗过程常出现治疗抵抗、预后不良、肿瘤转移等现象, 严重降低患者的生存期与生活质量[3,4]。

光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 作为新兴肿瘤疗法的代表, 因其非侵入性、高选择性、低毒性与强大杀伤力等优点而备受关注[5]。其治疗机制包括: 通过直接生成活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 对肿瘤细胞产生直接杀伤作用, 同时也可引发免疫原性细胞死亡 (immunogenic cell death, ICD), 释放损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs), 如钙网蛋白、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)、高迁移率族蛋白B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 等, 从而刺激抗原呈递细胞成熟, 激活体内免疫[6,7]。先前研究表明, 将PDT与免疫疗法相结合, 能在精准杀灭肿瘤细胞时提高免疫检查点抑制剂响应率, 进一步激发体内获得性免疫[8]。

通过纳米载药系统递送光敏药物可有效降低光敏药物给药量, 增加药物靶向性, 减少不良反应, 因而是PDT在肿瘤治疗中的主要发展方向[9,10]。但囿于人体内复杂的生理及病理屏障阻碍, 导致能顺利到达肿瘤组织的药物量仅占给药剂量的0.7%[11,12]。研究表明纳米粒物理特性 (粒径、形状、表面电荷) 对药物体内循环、渗透、组织滞留与细胞内化等有显著影响[13-15]。一般而言, 高纵横比纳米棒更易被细胞摄取, 而低纵横比纳米球具有更优的渗透能力[16]。可变形纳米粒通过响应TME特征 (如pH、谷胱甘肽) 或外部刺激 (光/磁场), 实现智能形变: 在血液中维持球状, 到达病灶快速渗透进入肿瘤内部, 进而在TME刺激下转化为纤维状, 提高滞留性, 突破生理屏障[17,18]。因此, 作者将可变形多肽融入纳米体系设计, 以兼顾纳米粒在体内循环的稳定性与进入肿瘤内部的滞留性。

本文聚焦TME响应型形状变化纳米递药系统开发, 整合化疗、PDT和免疫疗法, 提出一种基于ROS与基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2) 双响应纳米胶束的化学药物−免疫−光动力联合治疗策略, 用于乳腺癌的治疗。该胶束由两种长短不一的两亲性多嵌段分子链通过超声乳化法嵌插形成。短链以光敏药物焦脱镁叶绿酸a (pyropheophorbide a, Ppa) 作为疏水端, 通过连接基团叔丁基羰基 (Boc)-乙二胺与可对MMP-2响应变形的多肽PMGMRKLVFF相连, 然后在多肽另一端连接亲水基团聚乙二醇2000 (polyethylene glycol 2000, mPEG2000), 得到$mPEG_{2000}$-PMGMRKLVFF-Ppa (PPP)。其中可变形多肽由MMP-2响应段PMGMR和变形段KLVFF两部分组成, 当两者相连时前者末端脯氨酸特殊的内环结构可抑制后者自身的*β*-折叠结构, 使短链保持线性。长链则是通过ROS响应基团酮缩硫醇 (thiolactone ketal, TK) 将*D*型程序性细胞死亡−配体1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) 抑制剂 (*D*-type PD-L1 peptide antagonist, dPPA) 与PEG5000-DSPE相连接, 形成DSPE-TK-PEG_{5000}-dPPA (DTPD)。化疗药物紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 物理包载于胶束的疏水内核中, 形成最终的递药系统

(PTX@DTPD-PPP)。药物通过静脉注射进入体内, 通过增强渗透与保留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 与长链末端的dPPA主动靶向作用, 选择性地富集于肿瘤组织中。纳米粒PTX@DTPD-PPP在MMP-2与ROS作用下, 短链多肽MMP-2响应段与TK基团响应断裂, 从而打破材料的亲疏水平衡, 使疏水作用力主导的球形倾向于解散, 同时残余片段中KLVFF序列的β折叠作用成为主导作用力, 从而使得形态由球形转化为纤维, 增加光敏药物在肿瘤内的滞留与摄取, 同时释放出PTX与dPPA。然后通过PTX与PDT诱导肿瘤细胞凋亡, dPPA与PD-L1结合而解除TME免疫抑制效应。这种化疗–光动力–免疫治疗协同策略突破了传统单一疗法的局限性, 有望为乳腺癌的靶向治疗提供新的治疗思路与解决方案。

材料与方法

药物与试剂 焦脱镁叶绿酸 (货号: 24533-72-0, 上海笛柏生物科技有限公司); $mPEG_{2000}$-COOH (批号: I04113, 上海艾圣生物科技有限公司); DSPE-TK-PEG_{5000}-NH_2 (货号: YS-DTK32405, 重庆渝偲医药科技有限公司); 紫杉醇 (货号: 33069-62-4)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (货号: 25952-53-8)、*N*-羟基丁二酰亚胺 (货号: 6066-82-6) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Boc-乙二胺 (货号: N802949-1g, 上海麦克林生化科技股份有限公司); *D*型PD-L1抑制剂 (批号: TP-CH-3840, 南京淘普生物技术有限公司); MMP响应多肽Fmoc-Pro-Met-Gly-Met-Arg-Lys (Dde)-Leu-Val-Phe-Phe (批号: JT-173340, 上海德翅生物科技有限公司); 胶原酶潜酶活化剂 (货号: 6283-24-5)、色谱级无水乙腈 (货号: 75-05-8)、色谱级无水甲醇 (货号: 67-56-1) 购自Sigma-Aldrich; 重组人源MMP-2酶 (货号: 554302, Abcam公司); RPMI 1640培养基 (货号: L210KJ)、DMEM-高糖培养基 (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: Z7185FBS-500, Gibco公司); 青链霉素混合液 (货号: P1400)、抗荧光淬灭剂 (货号: S2100) 购自北京索莱宝科技有限公司; 胰酶细胞消化液 (货号: BL512A, 北京兰杰柯科技有限公司); 多聚甲醛 (货号: 3076-99, 天津致远化学试剂有限公司); 4′,6-双脒基-2-苯基吲哚 (货号: C1002)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒 (货号: C1383S)、Calcein-AM/PI活细胞/死细胞双染试剂盒 (货号: C1371S) 购自碧云天生物技术公司; 3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑噻唑蓝 [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT, 货号: 298-93-1, BioFroxx公司]; Transwell嵌套 (货号: 3422, 美国康宁公司)。

仪器 十万分之一电子天平 [Quintix65-1CN, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; 酶联免疫检测仪 (Multiskan MK3, 赛默飞世尔科技中国); 纳米粒度及zeta电位分析仪 (90PLUS PALS, 美国布鲁克海文仪器公司); 高效液相色谱仪 (Prominence Plus LC-30A, 日本岛津仪器有限公司); 流式细胞仪 (NovoCyte, 美国安捷伦科技公司); 倒置荧光显微镜 (DMi8, 德国徕卡公司); 激光器 (PSU-III-LED, 长春新产业光电技术有限公司); 倒置荧光显微镜 [Ts2RFL, 尼康仪器 (上海) 有限公司]。

短链合成 称量4.98 mg Ppa (3 equiv.)、5.35 mg EDC·HCl (9 equiv.) 和3.21 mg NHS (9 equiv.) 于2 mL DMF中, 振荡溶解, 25 ℃条件下避光活化Ppa羧基1 h。然后将2.95 μL Boc-乙二胺 (6 equiv.) 溶于1 mL DMF中, 缓缓滴入Ppa活化溶液中, 再加入3.88 μL三乙胺 (9 equiv.) 作为缚酸剂, 室温条件下避光反应14 h。用超纯水稀释至8 mL, 调节pH至6～7, 通过DCM萃取纯化。使用旋转蒸发仪除去DCM, 加入体积为有机相体积2/3的三氟乙酸TFA, 在DCM溶剂体系下室温反应3 h, 以脱去保护乙二胺另一端氨基的Boc基团。反应结束, 旋转蒸发挥干反应体系内的DCM和TFA, 随后加入饱和碳酸氢钠溶液调节pH至7～8。通过萃取得到纯化的Ppa-NH-C_2H_4-NH_2。称取5 mg多肽Fmoc-PMGMRK (Dde) LVFF或Fmoc-RPGFGNK (Dde) LVFF (1 equiv.) 以及1.78 mg EDC·HCl (3 equiv.) 和1.07 mg NHS (3 equiv.), 溶于1 mL DMF中室温活化1 h。将上述Ppa-NH-C_2H_4-NH_2加入活化的多肽中, 加入1.29 μL三乙胺 (3 equiv.), 30 ℃环境下避光搅拌24 h, 加入有机相体积25%的4-甲基哌啶溶液, 搅拌1 h, 以脱去保护多肽N端氨基的Fmoc基团, 透析纯化。通过基质辅助激光解吸飞行时间质谱 (matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 确认合成成功。将9.31 mg $mPEG_{2000}$-COOH (1.5 equiv.) 与EDC·HCl和NHS (4.5 equiv.) 溶于2 mL DMF, 活化1 h。将脱了Fmoc基团的冷冻干燥多肽样品与三乙胺 (4.5 equiv.) 溶解加入$mPEG_{2000}$-COOH活化液中, 室温搅拌48 h。向反应体系中加入有机相体积2%的水合肼溶液, 搅拌1 h, 以脱去Dde基团。透析纯化, 冷冻干燥得短链样品。通过飞行质谱确认产物合成完全。

长链合成 称量5 mg dPPA多肽样品与1.84 mg EDC·HCl (3 equiv.) 和1.11 mg NHS (3 equiv.) 溶于2 mL DMF, 活化1 h。再称量24.11 mg DSPE-TK-PEG_{5000}-NH_2或DSPE-PEG_{5000}-NH_2 (1.5 equiv.), 溶解后

滴入dPPA活化液中, 37 ℃条件下搅拌48 h。透析过夜, 冷冻干燥得产品。通过飞行时间质谱确认产物成功合成。

纳米粒制备 本课题使用超声乳化法制备。称取固定比例的短链分子和长链分子 ($M_{短}$∶$M_{长}$ = 2∶1), 以及载体总质量10%的PTX, 将三者溶于0.2 mL DCM中, 超声振荡使其充分溶解, 然后加入2 mL超纯水。将混合溶剂在冰水浴的条件下超声乳化。然后通过旋转蒸发仪除去乳液中的DCM, 等溶液澄清且无DCM流出之际即停止旋转, 收集样品。随后将样品离心 (5 500 r·min^{-1}、10 min), 吸取上清液, 弃去沉淀。随后将样品加入超滤离心管中, 超滤 (5 000 r·min^{-1}、15 min) 浓缩, 以除去溶于水相的微量PTX和Ppa。

PTX@DTPD-PPP的表征 本研究使用纳米粒度及zeta电位分析仪检测4组制剂的粒径大小与表面电荷, 用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察PTX@DTPD-PPP的外观形态并测定其粒径。将PTX@DTPD-PPP制剂分为3组, 分别向其中加入等体积2×磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 7.4)、制剂组溶液体积1/2的3 × Assay Buffer溶液 (150 mmol·L^{-1} 三羟甲基氨基甲烷, 30 mmol·L^{-1} $CaCl_2$, 450 mmol·L^{-1} NaCl, 0.15%聚氧乙烯月桂醚, pH 7.5) 和等体积含有20%胎牛血清的2×PBS溶液中。将各组制剂放置于恒温摇床 (37 ℃、70 r·min^{-1}) 中避光孵育, 于0、2、4、8、12、24 h预设时间点定量吸取60 μL溶液进行粒径测量, 以检测PTX@DTPD-PPP的体外稳定性。分别通过酶联免疫检测仪与高效液相色谱仪检测单位质量纳米载体所包载的Ppa与PTX质量。纳米制剂通过无水乙腈破乳稀释100倍, 涡旋15 s至混合均匀, 水浴超声, 然后使用有机系0.22 μm微孔滤膜进行过滤, 弃去初滤液, 即可上机测定。PTX检测参数如下: 流动相, 纯水∶无水乙腈 = 60∶40; 柱温, 30 ℃; 紫外检测器检测波长, 231 nm; 流速, 1 mL·min^{-1}; 进样量, 10 μL。

PTX@DTPD-PPP的体外变形响应与释放实验 使用纳米粒度及zeta电位分析仪检测PTX@DTPD-PPP、PTX@DPD-PPP (MMP-2单响应)、PTX@DTPD-PRP (ROS单响应)、PTX@DPD-PRP (无响应) 4组制剂在模拟TME的体外环境下 (37 ℃、70 r·min^{-1}、300 ng·mL^{-1} MMP-2酶、1 μg·mL^{-1} H_2O_2) 不同时间点的粒径变化趋势。利用TEM观察4组制剂在模拟TME环境下孵育4 h后的形态学变化。体外释放实验则是将4组新制备的制剂与MMP-2酶一起加入透析袋中 (Mr = 5 000 Da), 将透析袋放入15 mL离心管内, 浸没于10 mL释放介质液中 (含0.5% Tween 80的1 × Assay Buffer溶液 + 1 mmol·L^{-1} H_2O_2溶液), 将离心管置于恒温摇床 (37 ℃、70 r·min^{-1}) 中振摇, 分别在0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72 h时间点取1 mL释放介质液并补足, 将收集得到的释放介质液样本冷冻干燥后用无水乙腈溶解, 使用有机系0.22 μm微孔滤膜进行过滤, 弃去初滤液, 通过高效液相色谱仪检测PTX释放量。

4T1细胞培养 细胞来源于中国科学院上海细胞库。使用含10% Zeta血清的RPMI 1640培养基进行培养, 其成分包括RPMI 1640培养基 (500 mL)、50 mL胎牛血清、5.5 mL青霉素−链霉素混合溶液。将细胞皿放置于CO_2恒温培养箱中 (5% CO_2、37 ℃) 培养, 细胞处于对数生长期时可用于细胞实验。

细胞摄取实验 为评估4T1细胞对不同制剂的摄取能力是否存在明显差别, 本课题利用流式细胞术与共聚焦显微成像分别从定量和定性的角度检测细胞中的Ppa荧光水平。首先, 向PTX@DTPD-PPP、PTX@DPD-PPP、PTX@DTPD-PRP、PTX@DPD-PRP 4组制剂加入溶液体积1/2的3 × Assay buffer溶液, 在MMP-2酶切 (浓度300 ng·mL^{-1})、H_2O_2浓度为1 μg·mL^{-1}的环境下孵育12 h后, 再用无血清培养基稀释至Ppa质量浓度相同 (4 μg·mL^{-1})。将4T1细胞与各组制剂分别孵育1和4 h, 收集细胞, 离心洗涤后使用流式细胞仪检测每组Ppa荧光值。定性摄取实验同样分为PTX@DTPD-PPP、PTX@DPD-PPP、PTX@DTPD-PRP、PTX@DPD-PRP 4组。将4T1细胞以每孔8×10^{4}个细胞的密度接种到预先置有20 mm × 20 mm盖玻片的12孔板中, 每组制剂铺6个孔, 对应1和4 h。孵育相应时间后, 吸弃含药无血清培养基, 用冷PBS洗两遍, 加入4 ℃的4%多聚甲醛溶液固定30 min。然后再用冷PBS溶液清洗两遍, 加入0.5 μg·mL^{-1} DAPI溶液给细胞核染色, 避光孵育20 min。染色结束, PBS溶液清洗3次。挑出盖玻片, 将水分吸干后放置于滴有抗荧光淬灭剂的载玻片上, 用指甲油封片, 待凝固后通过共聚焦倒置荧光显微镜成像拍摄, 观察不同制剂组Ppa信号的差别。

肿瘤球培养 将高温加热后的2%低熔点琼脂糖DMEM-高糖培养基溶液 (*w*/*w*) 分装至96孔板内, 待冷却30 min后将生长至达到皿面积80%的4T1细胞消化, 通过含10% Zeta血清的DMEM-高糖培养基重悬并收集细胞, 加入铺有琼脂糖凝胶的96孔板内, 在CO_2恒温培育箱内培养1周左右, 通过光学显微镜甄别出形态成球的肿瘤球分组备用。

肿瘤球摄取实验 将遴选出来形态完好的肿瘤球根据处理方式分为摄取组与滞留组。用无血清DMEM-高糖培养基将新制剂的4组药物通过荧光定量稀释至Ppa质量浓度为5 μg·mL^{-1}, 根据制剂分组情况加入不

同孔中。将渗透组与各组药物放入CO_2恒温培育箱孵育12 h, 然后PBS清洗两次, 加入冷4%多聚甲醛溶液进行固定30 min, 通过激光共聚焦荧光倒置显微镜对肿瘤球进行断层扫描, 检测不同深度下Ppa荧光强度。滞留组同样与各组药物孵育12 h。孵育结束, 吸弃滞留组内含药培养基, 加入PBS清洗两遍后换用无血清DMEM-高糖培养基, 继续培养12 h。然后清洗固定, 通过激光共聚焦荧光倒置显微镜对肿瘤球进行断层扫描。

光响应ROS生成实验 本课题同样从定量和定性两个方面评估细胞摄取药物后受近红外光激发产生ROS的能力。该实验以2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)作为ROS荧光探针。将细胞用胰酶消化后以每孔5×10^4个细胞的密度接种至24孔板中, 当细胞生长至孔面积80%时, 将细胞分为12个组, 分别为PBS ± L (L指激光组)、Ppa ± L、PTX@DPD-PRP ± L、PTX@DTPD-PRP ± L、PTX@DPD-PPP ± L、PTX@DTPD-PPP ± L, 每组3个孔。经酶标仪紫外可见分光光度法定量后, 用无血清的1640培养基将各组Ppa质量浓度稀释为2.5 μg·mL^{-1}。将各组制剂加入相应孔中, 孵育4 h。孵育结束后, 吸弃含药培养基, 用冷PBS清洗1遍后。然后根据细胞活性氧检测试剂盒说明书指示对探针进行装载, 孵育20 min后, 吸弃DCFH-DA染液, 用冷PBS清洗两遍后加入无血清的1640培养基。将激光组用650 nm激光每孔照射20 s, 然后用荧光倒置显微镜对ROS的水平进行成像和检测。在后续的ROS定量实验中, 将细胞用胰酶消化后以每孔8×10^4～9×10^4个细胞接种于12孔板中, 当细胞生长至孔面积80%时, 同样将细胞分为12个组, 每组3个孔。经酶标仪紫外可见分光光度法定量后, 用无血清的RPMI 1640培养基将Ppa质量浓度稀释为2 μg·mL^{-1}。将各组制剂加入相应孔中, 孵育3 h。孵育结束后, 吸弃含药培养基, 用冷PBS清洗1遍后。然后根据细胞活性氧检测试剂盒说明书指示对探针进行装载, 孵育20 min后, 吸弃DCFH-DA染液。用冷PBS清洗一遍后换上无血清1640培养基。将激光组用650 nm激光每孔照射20 s, 快速吸弃无血清培养基, 消化并用含10% Zeta血清的RPMI 1640培养基手机, 离心(2 000 r·min^{-1}、3 min)后收集细胞, PBS清洗, 再离心(2 000 r·min^{-1}、3 min), 吸弃上清液。最后用300 μL PBS重悬通过流式细胞仪定量检测各组荧光强度。

细胞毒性 4T1细胞消化后按每孔6 000个细胞接种于96孔板, 当细胞生长至孔面积80%时, 将其分为游离Ppa + L组、游离PTX组、PTX@DPD-PRP ± L、PTX@DTPD-PRP ± L、PTX@DPD-PPP ± L、PTX@DTPD-PPP ± L各组, 用无血清RPMI 1640培养基将各组药物Ppa质量浓度调为0、0.005、0.05、0.5、2、5、10、12 μg·mL^{-1}各组设置6个复孔。各组制剂孵育4 h后, 将含有药物的培养基吸出, 加入90 μL无血清培养基。将激光组用650 nm激光每孔照射10 s, 孵育12 h, 吸弃培养基后加入0.5 mg·mL^{-1} MTT的PBS溶液, 在CO_2恒温培养箱中孵育4 h。孵育结束后每孔用PBS溶液洗涤两次, 然后加入150 μL DMSO, 将96孔板放置于恒温摇床上避光孵育15 min (37 ℃、70 r·min^{-1})。随后用酶标仪测定490 nm处的吸光度值, 按照公式计算细胞存活率: 细胞存活率(%) = $[(A_s-A_b)/(A_c-A_b)]\times100\%$, 其中$A_s$为实验组的吸光度值, A_c为阴性对照组的吸光度值, A_b为空白孔的吸光度值。然后根据MTT实验数据计算得到的半抑制浓度(lowest half-maximal inhibitory concentration value, IC_{50}), 用无血清的PRMI 1640培养基将PBS ± L、游离Ppa + L、游离PTX、PTX@DPD-PRP ± L、PTX@DTPD-PRP ± L、PTX@DPD-PPP ± L、PTX@DTPD-PPP ± L 12个制剂组的Ppa质量浓度稀释为0.25 μg·mL^{-1}。将细胞消化后以每孔5×10^4个细胞接种于24孔板中, 当细胞生长至孔面积80%时, 分别加入相应的制剂孵育4 h, 吸弃含有药物的培养基, 用PBS洗涤两遍后, 换上不含血清的RPMI 1640培养基。用650 nm激光照射激光组, 每孔20 s。将所有板子放回CO_2恒温培养箱后孵育2 h, 然后吸弃无血清培养基, 用钙黄绿素/碘化丙啶(Calcein/PI)染色剂(Calcein与PI的终质量浓度分别为5和10 μg·mL^{-1})避光染色30 min, 冷PBS洗涤两遍后放置在荧光倒置显微镜下成像观察。

细胞迁移与侵袭实验 采用划痕实验与Transwell实验测定不同制剂组对4T1细胞迁移与侵袭的抑制能力。在划痕实验中, 将生长状态良好并饥饿处理后的4T1细胞消化后按每孔8×10^4个细胞接种于12孔板中, 设置11个组, 即PBS、PTX、Ppa + L、PTX@DPD-PRP ± L、PTX@DTPD-PRP ± L、PTX@DPD-PPP ± L、PTX@DTPD-PPP ± L组, 每组3个孔。待细胞生长面积达到孔面积80%左右时, 用10 μL枪头沿标记线垂直于皿表划痕。用PBS洗涤3次, 以去除脱落细胞。然后根据分组情况分别加入相应制剂(Ppa质量浓度为0.25 μg·mL^{-1}), 放入37 ℃、5% CO_2细胞恒温培养箱中培养。给药4 h后, 将各组药液吸弃, PBS洗涤两遍, 再换上含有5% Zeta血清的1640培养基。同时激光组接收650 nm激光照射。放归培养箱孵育12 h过夜, 用冷4%多聚甲醛固定30 min, 再加入0.5%结晶紫水溶液染色, 用倒置共聚焦显微镜明场拍摄。在Transwell实验中, 将生长状态良好并饥饿处理后的4T1细胞消化

并计数, 用无血清培养基重悬至每毫升3×10^6个细胞, 每孔100 μL接种于Transwell嵌套上室。随后向上室加入100 μL含不同制剂组药物无血清培养基 (Ppa质量浓度为0.5 μg·mL^{-1}), 包括PBS、游离Ppa + L、游离PTX、PTX@DTPD-PPP、PTX@DPD-PRP + L、PTX@DTPD-PRP + L、PTX@DPD-PPP + L、PTX@DTPD-PPP + L组。下室加入600 μL的含10% Zeta血清RPMI 1640培养基作为趋化剂。在CO_2细胞恒温培养箱中孵育4 h后, 激光组用650 nm激光照射15 s, 再在细胞恒温培养箱中孵育24 h。吸弃上室与下室液体, PBS洗涤两次后用4%多聚甲醛固定20 min, 再用0.1%结晶紫溶液将上室膜下层细胞染色30 min, 棉签轻擦去上层细胞, PBS清洗2次后再风干, 置于倒置共聚焦显微镜下观察上室膜下层迁移细胞数。

统计学方法 采用GraphPad Prism 10.0软件进行统计分析并作图, 组间比较采用独立样本t检验。各组数据结果以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$差异具有统计学意义。

结果

1 多嵌段分子的合成

本研究通过液相色谱−质谱联用 (liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS) 与MALDI-TOF-MS对长链与短链中间体及终产物的分子质量进行表征。Ppa首先与Boc-乙二胺相连, 并脱去Boc基团, 用LC-MS检测产物分子质量, 观察到Ppa-NH-C_2H_4-NH_2的峰677.3 [M+H] 与699.4 [M+23], 从而确认Ppa-NH-C_2H_4-NH_2合成成功 (图1A)。Ppa-NH-C_2H_4-NH_2连接MMP-2响应性多肽并脱去Fmoc保护基团后, 通过MALDI-TOF-MS检测分子质量, 确认分子峰从677.3转移至1 990, 证明多肽与linker成功连接 (图1B)。

继续用MALDI-TOF-MS对终产物PPP、PRP、DTPD、DPD的分子质量进行表征 (图1C～F), 短链产物分子峰从2 000左右转移至3 000左右, 而长链分子峰从5 000左右转移至6 000左右, 证明终产物合成完全。

2 PTX@DTPD-PPP的表征

PTX@DTPD-PPP粒径分布图与TEM图像如图2A、B所示。PTX@DTPD-PPP水合粒径约为144 nm, 多分散系数 (polymer dispersity index, PDI) 为0.226, 表明其质地均匀, 粒径较小, 且处于EPR效应生效范围。通过电泳光散射分别测量了DTPD@PTX、PPP@PTX和PTX@DTPD-PPP的电位, 确认3组制剂表面均带负电荷, 有利于在体内循环中保持稳定 (表1)。

稳定性实验表明, PTX@DTPD-PPP在加入PBS溶液和1 × Assay Buffer溶液后粒径有所上升, 但基本能在24 h以内保持粒径尺寸稳定于200～230 nm。而在含有10%胎牛血清的PBS溶液中, PTX@DTPD-PPP则只能稳定存在12 h左右, 这可能是因为血浆蛋白附着于纳米粒表面导致粒径增加 (图2C)。

为了准确测量不同制剂组内Ppa与PTX的含量与比例关系, 首先通过HPLC与酶标仪分别测得Ppa与PTX的标准曲线, 然后将新鲜制得的各组制剂药物破乳后测量, 计算得各组制剂的包封率 (encapsulate efficiency, EE) 与载药量 (drug loading capacity, DLC)。

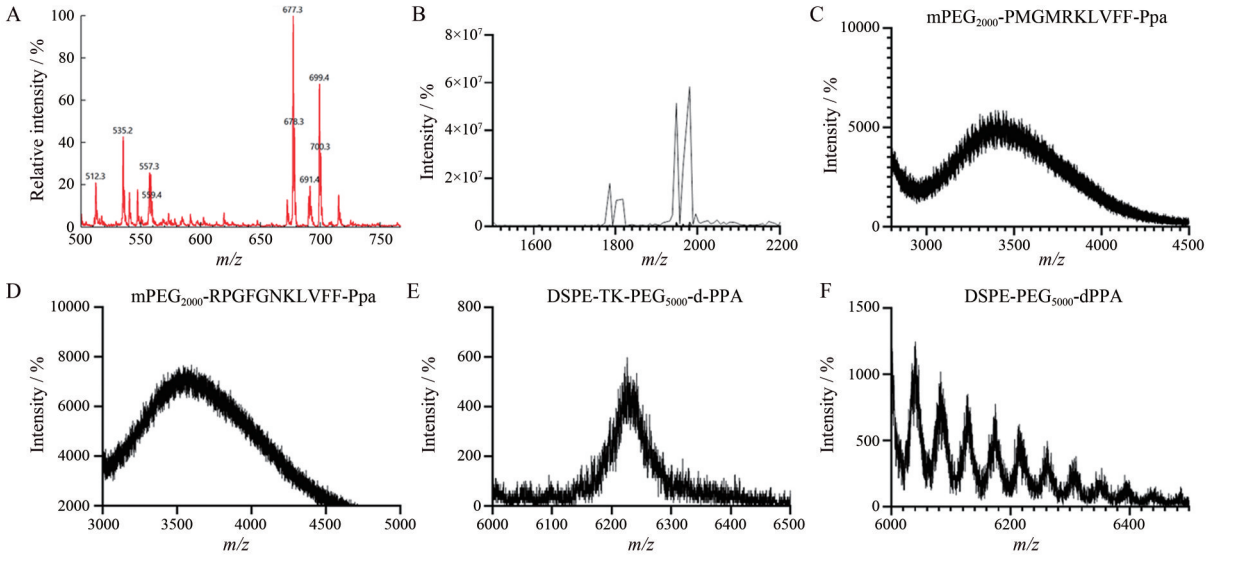


Figure 1 Mass spectrometer spectra of intermediates and end-products of short chains and long chains. A: Liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS) spectrum of Ppa-NH-C_2H_4-NH_2; B−F: The MALI-TOF-MS spectrum of PMGMRK (Dde) LVFF (B), PPP (C), PRP (D), DTPD (E), and DPD (F). Ppa: Pyropheophorbide a; dPPA: *D*-Type PD-L1 peptide antagonist; PPP: mPEG$_{2000}$-PMGMRKLVFF-Ppa; PRP: mPEG$_{2000}$-RPGFGNKLVFF-Ppa; DTPD: DSPE-TK-PEG$_{5000}$-dPPA; DPD: DSPE-PEG$_{5000}$-dPPA

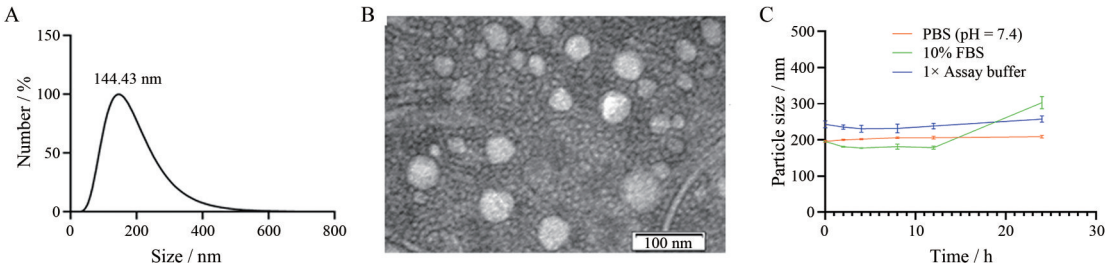


Figure 2 Characterisation of PTX@DTPD-PPP. A: The effective diameter of PTX@DTPD-PPP; B: The transmission electron microscope (TEM) image of PTX@DTPD-PPP. Scale bar = 100 nm; C: Changes of particle size of PTX@DTPD-PPP in PBS, 10% FBS, 1 × Assay Buffer within 24 h. PTX: Paclitaxel. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Table 1 The hydrodynamic diametres and polymer dispersity index (PDI) of different formulations

Formulation	Hydrodynamic diameter/nm	PDI
PTX@DTPD-PPP	144.0 ± 1.3	0.226 ± 0.014
PTX@DPD-PPP	188.0 ± 3.9	0.221 ± 0.010
PTX@DTPD-PRP	163.2 ± 0.6	0.242 ± 0.024
PTX@DPD-PRP	193.8 ± 4.4	0.247 ± 0.017

结合各组数据可知, 其长短链嵌段的差异并未对各组载药量与包封率造成可观的影响。而且各组 PTX 与 Ppa 含量之比基本固定在 1.5 左右。这也为后续体外细胞实验与体内实验的游离组给药提供了定量依据 (表 2)。

Table 2 Drug loading capacity (DLC) and encapsulate efficiency (EE) of PTX and the DLC of Ppa in different formulations

Formulation	PTX DLC/%	Ppa DLC/%	PTX EE/%
PTX@DTPD-PPP	6.28 ± 0.42	9.38 ± 0.63	83.74 ± 5.60
PTX@DPD-PPP	4.77 ± 0.40	7.53 ± 0.71	63.66 ± 5.29
PTX@DTPD-PRP	7.08 ± 5.63	10.72 ± 0.63	94.35 ± 7.51
PTX@DPD-PRP	6.94 ± 0.22	9.72 ± 0.63	92.52 ± 2.93

3 体外响应与释放实验

PTX@DTPD-PPP 与 PTX@DPD-PPP 两个可变形组在 MMP-2 与 ROS 共同作用下水合粒径急剧增大, 说明纳米粒的 MMP-2 响应多肽片段暴露后被切割, 导致纳米粒形状由球形转化为纤维 (图 3A)。后续的 TEM 拍摄图像观察到, 为可变形组发生 MMP-2 响应, 由球状转化为纤维状的理论提供了直观的形态学证据, 而不具有变形能力的组则保持了均一的球状形态, 为后续的细胞实验打下了坚实的基础 (图 3B)。

体外释放结果证明两个可变形组在 8 h 以内累计释放率达到了 70% 左右, 接近两个不可变形组 PTX@DTPD-PRP 与 PTX@DPD-PRP 的两倍, 进一步证明了该纳米递药体系优秀的药物递送能力 (图 3C)。

4 摄取实验与光响应 ROS 生成实验

共聚焦图像结果显示, 酶切变形组的细胞摄取量明显多于两个未变形组 (图 4A)。流式结果进一步证明, PTX@DTPD-PPP 在 4 h 的光敏剂荧光强度分别约为两个单响应组 PTX@DPD-PPP、PTX@DTPD-PRP 的 1.51

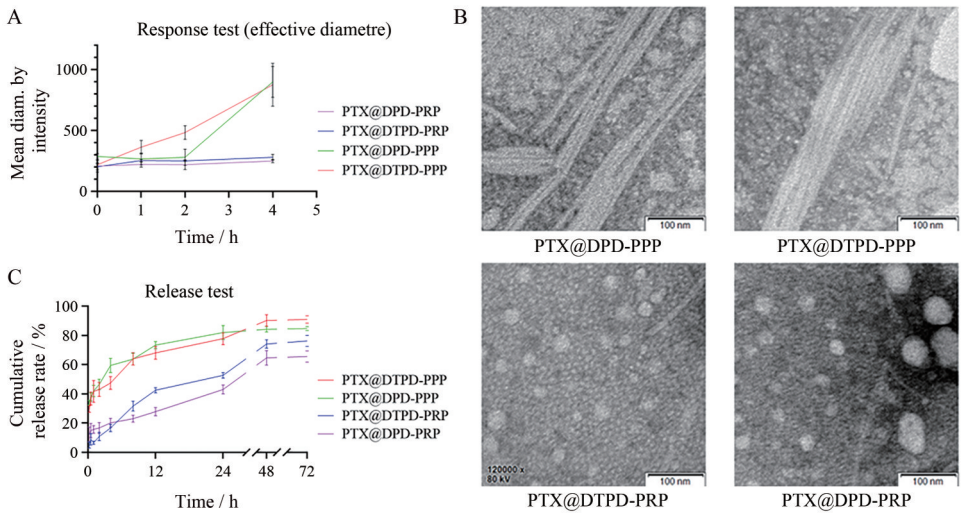


Figure 3 Response experiments of PTX@DTPD-PPP and other formulations. A: The size over time profiles of different formulations under the condition of 300 ng·mL^{-1} MMP-2 and 1 μg·mL^{-1} H_2O_2; B: TEM of different preparations after being incubated with MMP-2 and H_2O_2. Scale bar = 100 nm; C: The responsive release of PTX from different formulations

和1.68倍, 约为无响应组PTX@DPD-PRP的1.77倍 (图4B), 说明4T1细胞对双响应组的摄取量较之其他制剂组存在显著的增加 ($P < 0.001$)。这说明形状变化有助于增加肿瘤细胞对纳米粒的摄取, 诸多文献报道[19,20]也印证了这一事实。这主要是因为纤维与肿瘤细胞膜接触面积更大, 其细长形态也有助于穿过组织间隙从而接触到肿瘤细胞。此外, 纳米球所具有的刚性也有可能导致其通过内吞途径进入细胞受阻。光响应ROS生成实验为可变性纳米粒在肿瘤细胞内蓄积量增加的结论提供了佐证。PBS在光照与无光照条件下均无荧光信号, 说明激光照射本身不对ROS生成造成影响。在4个制剂组中, PTX@DPD-PPP±L、PTX@DTPD-PPP±L两个变形组ROS生成水平显著高于两个不变性组, 这与先前的细胞摄取实验结果相一致, 进一步证明形状由球形变为纤维状的纳米粒更容易被细胞摄取并滞留在细胞内部, 从而产生更多的ROS。而在游离组中, 未照激光的Ppa组的ROS水平基本与PBS组一致, 说明Ppa本身不会导致ROS生成 (图4C、D)。

鉴于2D肿瘤模型缺乏对肿瘤细胞与ECM交互作用, 无法精确地模拟实际肿瘤的微环境。因此作者构建具有TME的肿瘤球模型, 以评估各制剂组药物在肿瘤组织中的摄取分布情况。PTX@DTPD-PPP组与PTX@DPD-PPP组相较于不可变形组, 无论是在滞留组还是摄取组都表现出了更强的Ppa荧光信号。在滞留组内, 不可变形组基本上在80 μm处便出现了较为明显的Ppa荧光信号衰减, 而变形组则在该深度下保持在一个相对较高的值 (图4E), 表明PTX@DTPD-PPP在组织层面上同样具有更强的肿瘤摄取及滞留能力。

5 细胞毒性实验

MTT实验结果表明, 近红外光照射条件下, 当Ppa质

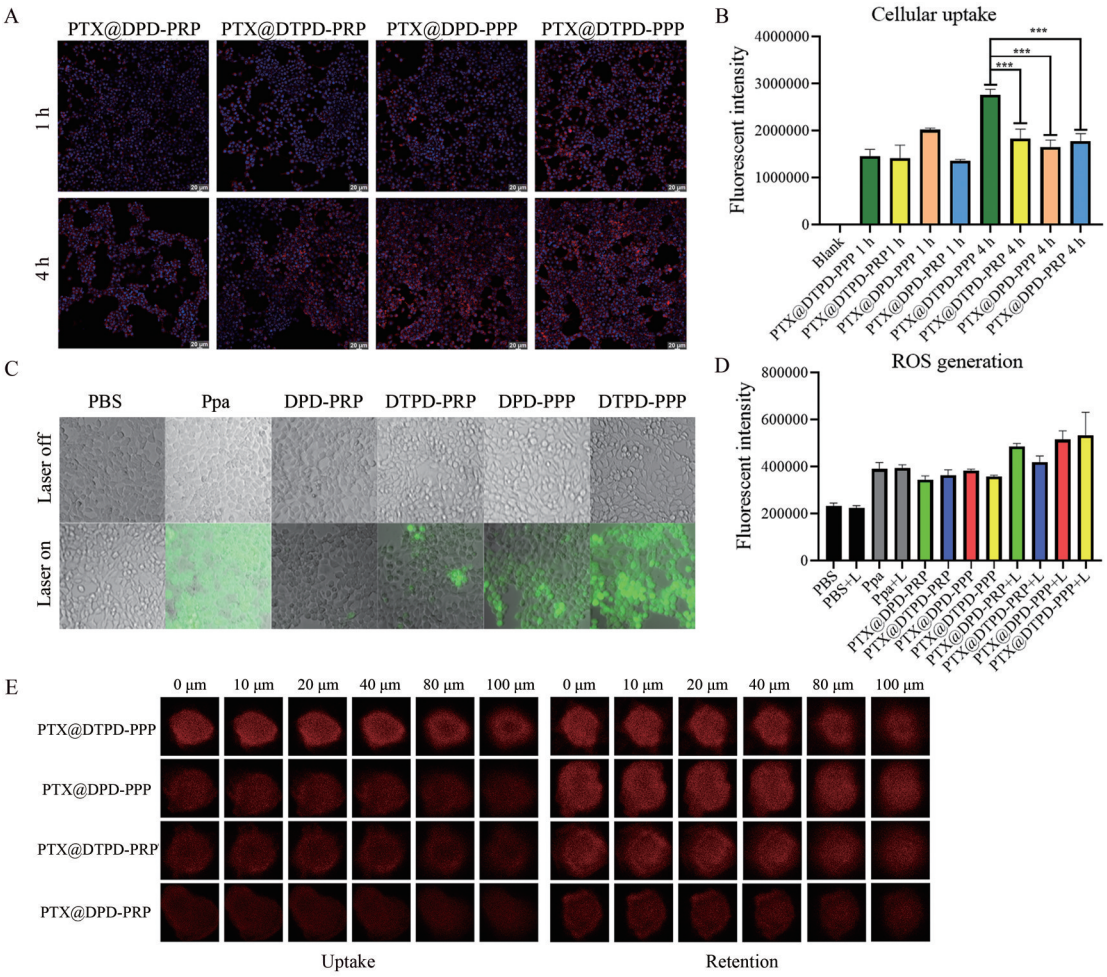


Figure 4 Cellular uptake experiments. A: Confocal laser scanning microscope of 4T1 cells that were co-incubated with different formulations for 1 or 4 h. The scale bar represents 20 μm; B: Flow cytometry of 4T1 cells that were co-incubated with different formulations for 1 or 4 h; C: Confocal laser scanning microscope of ROS produced by 4T1 cells co-incubated with different formulations. The green florescence represents ROS. The scale bar represents 20 μm; D: Flow cytometry of ROS produced by 4T1 cells co-incubate with different formulations; E: The 3D confocal images of 4T1 tumor spheroids incubated with different formulations in the groups of uptake and retention

量浓度 > 0.5 μg·mL^{-1}, 同时PTX质量浓度 > 0.33 μg·mL^{-1}时, 各制剂组细胞毒性显著增加。此外, PTX@DTPD-PPP + L在0.005～5 μg·mL^{-1}细胞毒性最强, 其半抑制浓度 (IC_{50}) 最低, 仅为0.44 μg·mL^{-1} (图5A)。而图5B结果显示, 各制剂组仅通过PTX抗微管作用与ICI免疫激活作用杀伤肿瘤时并不存在显著的药效差异。通过Calcein-AM/PI染色的活死细胞双染实验, 本研究进一步比较不同制剂组处理后的细胞毒性效应。PBS组无论是否被激光照射都能全部生存, 说明激光照射本身并不具有细胞杀伤能力。激光照射组的细胞毒性普遍大于无激光照射组, 证明其对细胞的杀伤作用除了PTX的干扰有丝分裂作用之外, 还有光响应后Ppa生成ROS导致肿瘤细胞膜损伤等引发的凋亡与自噬机制, 相较于PTX@DPD-PRP与PTX@DTPD-PRP两个不变性组, 变形组的细胞死亡数量明显增加, 结合之前的细胞摄取与ROS生成实验, 进一步证明变形滞留对细胞杀伤的重要作用。综上表明, 变形成功的纳米粒凭借其在4T1细胞内蓄积量的优势拥有更大的杀伤力 (图5C)。

6 细胞迁移与侵袭实验

首先, 通过细胞划痕实验比较同等时间下不同制剂组细胞划痕愈合率以评估药物对4T1细胞迁移率的影响 (图6A、B)。结果表明, 即使没有650 nm激光照射, 纳米纤维本身也能抑制4T1细胞迁移; 激光照射后, PTX@DTPD-PPP组对创面愈合的抑制效果最佳, 创面愈合率相较于PBS组降低了24%。

然后, 分别通过两次Transwell实验进一步评估了药物对4T1细胞迁移与侵袭能力的抑制能力。在迁移实验中, 两个可变形组PTX@DTPD-PPP、PTX@DPD-PPP与游离药组和不可变性组相比, 细胞迁移率出现了显著的下降 ($P < 0.000\ 1$), 其中双响应组的细胞迁移率仅为PTX@DPD-PRP、PTX@DTPD-PRP、游离PTX组的50.92%、58.66%和26.26%。而在侵袭实验中, PTX@DTPD-PPP组的细胞迁移率同样显著低于各制剂组与游离组 ($P < 0.000\ 1$)。综上所述, PTX@DTPD-PPP + L对肿瘤细胞迁移与侵袭存在明显的抑制能力, 且该能力由纳米粒变形、PDT与PTX化疗协同作用决定 (图6C～F)。

讨论

综上所述, 本课题构建了一种可响应TME中上调的MMP-2酶与ROS释放药物, 同时发生形状变化的自组装胶束PTX@DTPD-PPP, 用于乳腺癌的PDT–化疗–免疫疗法联合治疗。该纳米粒通过长链的dPPA主

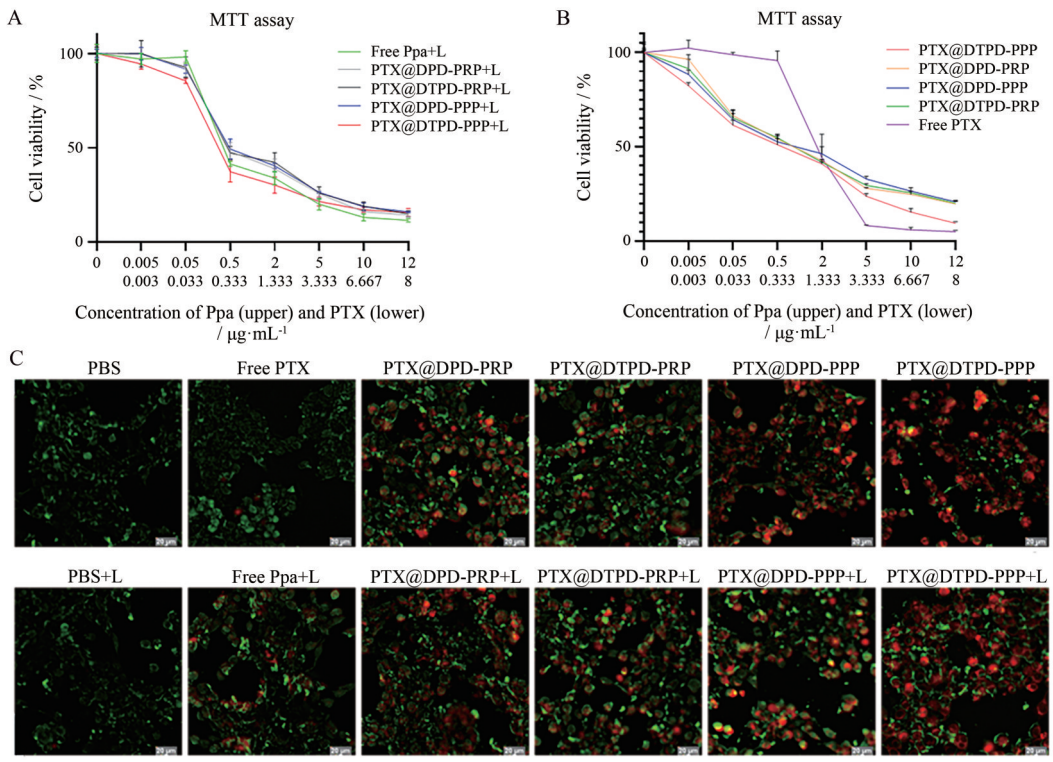


Figure 5 Cytotoxicity test of PTX@DTPD-PPP and other formations. A: MTT assay of 4T1 cells incubated with formulations of different concentrations with laser; B: MTT assay of 4T1 cells incubated with formulations of different concentrations without laser (n = 6); C: Calcein-AM/PI double staining of 4T1 cells treated with different preparations. 4T1 cells alive or dead were respectively stained to green (Calcein) and red (PI). Scale bar = 20 μm

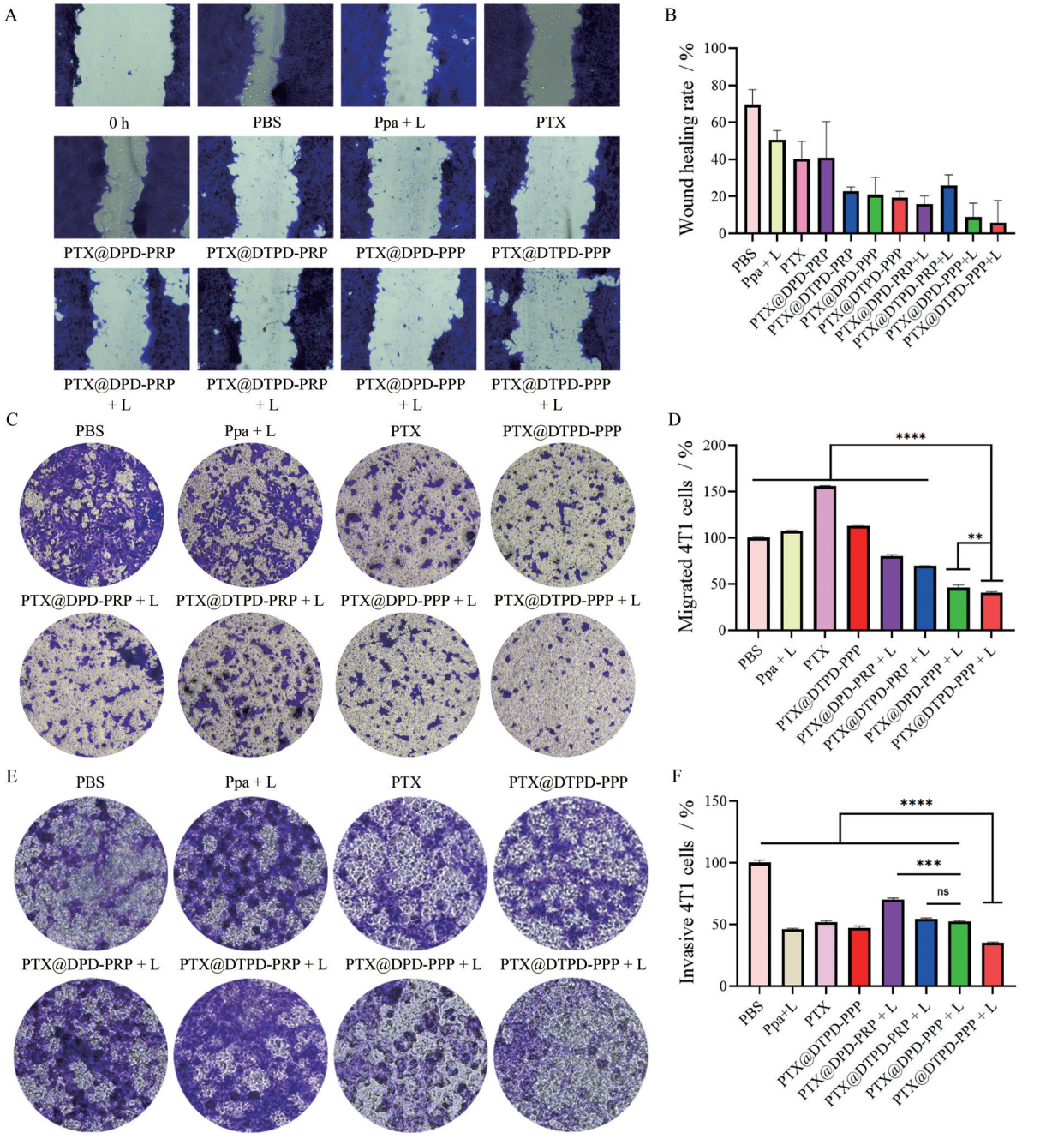


Figure 6 Cell migration and invasion assays. A: Microscopy images of 4T1 cells wounded and treated with different preparations; B: Wound healing rates of 4T1 cells wounded and treated with different preparations obtained by ImageJ; C: Microscope images of the Transwell migration assay of 4T1 cells incubated with different treatments; D: The transwell migration rate of 4T1 cells incubated with different treatments; E: Microscope images of the Transwell invasion assay of 4T1 cells incubated with different treatments; F: The transwell invasion rate of 4T1 cells incubated with different treatments. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$. ns: No significant difference

动靶向到乳腺癌病灶处, 受ROS作用进一步刺激释放靶头dPPA, 暴露出MMP-2酶切割靶点, 在MMP-2酶切割作用下, 纳米粒形状由球形转化为纤维, 获得更好的肿瘤滞留能力, 进而增强PDT的肿瘤清除效果。

首先, 合成了该纳米递送体系的两种基本组成元件, 多嵌段线性分子链DTPD和PPP以及其对应的无响应对照分子链DPD和PRP, 并通过液质联用技术和飞行时间质谱技术对样品的相对分子质量进行了表征; 然后, 通过超声乳化法实现了自组装纳米胶束的构建, 并对其处方工艺进行了筛选, 确定了制备过程中PPP与DTPD的质量之比、有机相配方和超声功率等参数, 从而制备得粒径均一、稳定且表面带负电荷的纳米粒。根据激光粒度仪及zeta电位分析仪测量结果显示, PTX@DTPD-PPP水合粒径为144.0 ± 1.3 nm, zeta

电位为−6.8 ± 0.9 mV。其中, PTX 的载药量和包封率分别为 (6.28 ± 0.42)%和 (83.74 ± 5.60)%, Ppa 的载药量为 (9.38 ± 0.63)%。在PBS溶液和1 × Assay Buffer溶液中可在24 h内保持良好稳定性。PTX@DTPD-PPP在300 ng·mL^{-1} MMP-2、1 μg·mL^{-1} H_2O_2条件下可于4 h内发生形态转化, 并释放出PTX与dPPA。

分别对纳米递药系统的靶向性、滞留性与治疗效果进行了评估, 先通过摄取实验、ROS生成实验和肿瘤球实验从细胞和组织层面证明了PTX@DTPD-PPP的可变形能力有利于增强肿瘤细胞对其摄取及滞留能力; MTT实验和活死细胞染色实验则证明了PTX@DTPD-PPP较之其他制剂组具有更强的肿瘤杀伤力。最后, 划痕实验和Transwell细胞迁移实验表明PTX@DTPD-PPP所融合的化疗−光动力疗法对肿瘤迁移与侵袭的加和抑制作用。

本研究设计的局限性主要源于组成该纳米递送系统的嵌段化合物结构比较复杂, 制备流程冗长。不过整体而言, 可变形纳米粒与PDT的联用在乳腺癌小鼠模型上表现出了较好的组织靶向性和滞留性, 有助于弥补PDT当前的临床转化瓶颈, 包括病灶处药物蓄积量低下、有效组织穿透深度不够的问题, 为推动乳腺癌光动力疗法的临床转化提出了创新性的解决方案。

作者贡献: 龚博锴负责纳米粒合成、表征和细胞实验; 肖岚参与纳米粒合成和细胞流式细胞仪检测; 邓珙楠和张锺权参与对纳米粒稳定性的表征与体外响应性分析; 贾文锋和童凡参与了细胞实验方案的设计与; 高会乐负责构思项目、设计实验和完成主要研究和撰写文章。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. Ca Cancer J Clin, 2024, 74: 229-263.

[2] Dogan I, Aydin E, Khanmammadov N, et al. Long-term outcomes and predictors of recurrence in node-negative early stage breast cancer patients [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2023, 149: 14833-14841.

[3] Dagogo Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15: 81-94.

[4] Nong SQ, Han XY, Xiang Y, et al. Metabolic reprogramming in cancer: mechanisms and therapeutics [J]. MedComm (2020), 2023, 4: e218.

[5] Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, et al. Photodynamic therapy- mechanisms, photosensitizers and combinations [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 1098-1107.

[6] Kleinovink JW, Van Driel PB, Snoeks TJ, et al. Combination of photodynamic therapy and specific immunotherapy efficiently eradicates established tumors [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22: 1459-1468.

[7] Ding X, Wang ZD, Yu QY, et al. Superoxide dismutase-like regulated Fe/Ppa@PDA/B for synergistically targeting ferroptosis/apoptosis to enhance anti-tumor efficacy [J]. Adv Healthc Mater, 2023, 12: 2301824.

[8] Yang KZ, Niu T, Luo MY, et al. Enhanced cytotoxicity and apoptosis through inhibiting autophagy in metastatic potential colon cancer SW620 cells treated with chlorin e6 photodynamic therapy [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2018, 24: 332-341.

[9] Sun LM, Liu HM, Ye YQ, et al. Smart nanoparticles for cancer therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8: 418.

[10] Shan X, Gong X, Li J, et al. Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12: 3028-3048.

[11] Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours [J]. Nat Rev Mater, 2016, 1: 16014.

[12] Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? [J]. J Control Release, 2016, 244: 108-121.

[13] Yu WQ, Liu R, Zhou Y, et al. Size-tunable strategies for a tumor targeted drug delivery system [J]. ACS Cent Sci, 2020, 6: 100-116.

[14] Miao Y, Du H, Zhang W, et al. Insights into tumor size-dependent nanoparticle accumulation using deformed organosilica nanoprobes [J]. Mater Chem Front, 2024, 8: 3321-3330.

[15] Chen J, Jiang Z, Zhang YS, et al. Smart transformable nanoparticles for enhanced tumor theranostics [J]. Appl Phys Rev, 2021, 8: 041321.

[16] Debrosse MC, Comfort KK, Untener EA, et al. High aspect ratio gold nanorods displayed augmented cellular internalization and surface chemistry mediated cytotoxicity [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013, 33: 4094-4100.

[17] Shao YR, Xiang L, Zhang WH, et al. Responsive shape-shifting nanoarchitectonics and its application in tumor diagnosis and therapy [J]. J Control Release, 2022, 352: 600-618.

[18] Jia W, Liu R, Wang Y, et al. Dual-responsive nanoparticles with transformable shape and reversible charge for amplified chemo-photodynamic therapy of breast cancer [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12: 3354-3366.

[19] Xu DW, Samways DSK, Dong H. Fabrication of self-assembling nanofibers with optimal cell uptake and therapeutic delivery efficacy [J]. Bioact Mater, 2017, 2: 260-268.

[20] Hassan HAFM, Haider M, Fahmy SA. From antigen uptake to immune modulation: the multifaceted potential of peptide nanofibers as vaccine nanocarriers [J]. Mater Adv, 2024, 5: 4112-4130.