甘草次酸和三苯基膦共介导多柔比星线粒体靶向的体外评价

陈慧婷，刘克海*
（上海海洋大学食品学院，上海 201306）

摘要：该研究以甘草次酸（GA）-多柔比星（**1**）-三苯基膦（TPP）为模型药，采用薄膜分散法制备透明质酸（HA）修饰的阳离子脂质体，构建了线粒体靶向递送系统（LP-G**1**T@HA），并评价了其制剂学相关性质及体外抗肿瘤活性。理化性质分析结果显示，LP-G**1**T@HA 粒径为（340.3±2.3）nm，包封率为（85.4±3.1）%，体外血清稳定性良好，溶血毒性低。体外细胞试验结果显示，LP-G**1**T@HA 对人乳腺癌细胞（MCF-7 细胞）增殖有明显的抑制作用，同时可诱导线粒体膜通透性转换孔开放，加速细胞凋亡，说明 LP-G**1**T@HA 可作为有效的线粒体靶向递送系统，实现高效抗肿瘤作用。

关键词：多柔比星；甘草次酸；线粒体靶向；透明质酸；阳离子脂质体；抗肿瘤活性
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)04-0562-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.04.012

In vitro Evaluation of Mitochondrial Targeting of Doxorubicin Co-mediated by Glycyrrhetinic Acid and Triphenylphosphine

CHEN Huiting, LIU Kehai*
(*College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306*)

ABSTRACT: Using glycyrrhetinic acid(GA)-doxorubicin(**1**)-triphenylphosphine(TPP) as a model drug, a targeted mitochondrial delivery system, namely the hyaluronic acid(HA)-modification cationic liposomes(LP-G**1**T@HA), was constructed by the film dispersion method. Moreover, its pharmacologically related properties and antitumor activity *in vitro* were evaluated. The results showed that the particle size and encapsulation rate of the LP-G**1**T@HA were (340.3±2.3) nm and (85.4±3.1) %, respectively, and it showed good *in vitro* serum stability and low hemolytic toxicity. *In vitro* cell experiments demonstrated that LP-G**1**T@HA significantly inhibited the proliferation of MCF-7 breast cancer cells, induced the mitochondrial permeability transition pore(MPTP) opening, and accelerated cell apoptosis, suggesting that LP-G**1**T@HA could be used as an efficient mitochondrial-targeted delivery system to achieve an efficient antitumor effect.

Key Words: doxorubicin; glycyrrhetinic acid; mitochondrial targeting; hyaluronic acid; cationic liposome; antitumor activity

线粒体作为真核细胞中一种重要的细胞器，除了为细胞提供能量外，还参与调节内源性细胞凋亡[1]。多柔比星（doxorubicin，**1**）是一种常见的蒽环类广谱抗肿瘤药物，可嵌入 DNA 双链碱基间形成稳定的复合物，破坏 DNA 结构，导致线粒体损伤，进一步诱导细胞凋亡。研究[2]表明，携带线粒体 DNA（mtDNA）的肿瘤细胞对 **1** 敏感性较高，而线粒体缺陷细胞对 **1** 表现出显著抗性，表明 mtDNA 是 **1** 的特异性、敏感性靶标。此外，诱导 mtDNA 损伤可避免强大的细胞核 DNA 损伤修复机制引起的耐药性[3]，且线粒体中的高脂质和 DNA 比，以及 mtDNA 的裸露开放性使抗肿瘤药能够优先聚集

收稿日期：2023-02-14
基金项目：国家自然科学基金项目(82172796)
作者简介：陈慧婷(1996—)，女，硕士研究生，专业方向：药物新剂型与新技术。
通信作者：刘克海(1977—)，男，博士，从事核酸等生物大分子药物靶向给药系统和基于多糖的功能性食品的研究。
E-mail：khliu@shou.edu.cn

在 mtDNA 上[4]。因此，靶向 mtDNA 可能是一种更快、更敏感的抗肿瘤化疗策略，而如何设计高效的递送系统将药物靶向递送至线粒体是亟需解决的关键问题。

由于生物学功能的变化，肿瘤细胞的线粒体膜电位高于正常细胞，这使得亲脂性阳离子更容易通过膜电位驱动作用靶向到肿瘤细胞线粒体[5]。三苯基膦（triphenylphosphine，TPP）作为一种典型线粒体定位剂，应用广泛，但线粒体膜的难通透性和有限的静电相互作用[6]，使 TPP 携带的药物部分聚集在膜表面，难以发挥疗效。线粒体膜通透性转换孔（mitochondrial permeability transition pore，MPTP）作为一种非特异性通道存在于线粒体内外膜之间，打开 MPTP 可能是提高线粒体渗透效率的一个新方向。甘草次酸（glycyrrhetinic acid，GA）是甘草的主要成分之一，可通过与线粒体呼吸链相互作用产生过氧化氢，诱导 MPTP 开放[7]。因此，GA 与 TPP 的联合应用有望进一步提高将 **1** 递送至线粒体内部的效率。透明质酸（hyaluronic acid，HA）是一种大分子黏多糖物质，对人体无毒，能与肿瘤细胞表面过表达的 CD44 分子特异性结合，具有肿瘤靶向作用。

基于此，本研究构建了 HA 修饰的阳离子脂质体（cationic liposomes，CLs）靶向递送 GA-**1**-TPP（G**1**T）至线粒体内部，所得的纳米载药体系称作 LP-G**1**T@HA。LP-G**1**T@HA 到达肿瘤组织后，与肿瘤细胞表面的 CD44 受体结合，可促进 CLs 被肿瘤细胞摄取[8]。在被内化后，CLs 可在溶酶体酸性条件下发生膜融合，将 G**1**T 前药释放到细胞质中；同时，G**1**T 中的腙键在低 pH 条件下断裂，释放 GA；随后，TPP-**1** 在 GA 的帮助下实现线粒体跨膜，进入线粒体内部并作用于 mtDNA，诱导线粒体损伤和细胞凋亡。

1 仪器与试药

RE3000-D 型旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；B150 型恒温细胞培养箱、MK3 型酶标仪（美国 Thermo Fisher 公司）；UV-1800 型紫外 - 可见分光光度计（上海美谱达仪器有限公司）；LF-1 型脂质体挤出器（加拿大 Avestin 公司）；FACSCalibur 型流式细胞仪（美国 BD 公司）；Zetasizer Nano ZSP 型纳米粒度电位仪（英国马尔文公司）；AE31 型荧光倒置显微镜（德国 Motic 公司）。

1（纯度≥ 98%，批号 D807083）、胆固醇（纯度≥ 90%，批号 C875467）、TPP（纯度≥ 98%，批号 C804268）（上海麦克林生化科技有限公司）；GA（上海贤鼎生物科技有限公司，纯度≥ 97%，批号 GJ797）；三氟乙酸（上海吉至生化科技有限公司，纯度≥ 99%，批号 T74921）；碳二亚胺盐酸盐（EDCI，纯度≥ 99%，批号 S30054）、*N*- 羟基硫代琥珀酰亚胺（NHS，纯度≥ 99%，批号 S20179）、葡聚糖凝胶（Sephadex G-50，上海源叶科技有限公司）；Hoechst 33342 染料（批号 L8260）、蛋黄卵磷脂（北京索莱宝科技有限公司）；硬脂胺（北京华威锐科化工有限公司，纯度≥ 95%，批号 SM18403-9）；透明质酸钠（上海兰拓生物科技有限公司）；RMPI 1640 培养基、胎牛血清（FBS）（美国 Gibco 公司）；噻唑蓝（MTT，上海源叶生物科技有限公司）；Caspase 3 检测试剂盒、ATP 检测试剂盒、MPTP 检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；其余化学试剂均为分析纯。

新鲜兔血（采集自新西兰大白兔）购自上海语纯生物科技有限公司。

人乳腺癌细胞（MCF-7 细胞）购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，培养条件：5% 二氧化碳，37 ℃，培养箱湿度 70%～ 80%。

2 方法与结果

2.1 LP-G**1**T@HA 的制备

照文献[9]方法合成 T**1**（纯度为 80%，核磁共振氢谱结果显示合成成功）。按物质的量比 1.5 ∶ 1 称取己二酸二酰肼（ADH）和 T**1**，溶于无水甲醇中，加三氟乙酸，室温下避光反应 24 h。旋蒸除尽无水甲醇，加入乙醇溶解，离心（3 220×*g*）20 min，取上清液，旋蒸除去有机溶剂得 ADH-**1**-TPP。按物质的量比 1.2 ∶ 1.5 ∶ 1.2 ∶ 1 称取 GA、EDCI、NHS 及 ADH-**1**-TPP 溶于无水甲醇中，室温下避光反应 24 h，然后置透析袋（截留分子量 1 000）中透析 24 h，再旋转蒸发至干燥状态，得 G**1**T（纯度为 80%，核磁共振氢谱结果显示合成成功）。

采用薄膜分散法制备脂质体。称取蛋黄卵磷脂 70 mg、胆固醇 20 mg、硬脂胺 10 mg，以及 T**1**

4.2 mg 或 G**1**T 6.7 mg，溶解在氯仿和甲醇（体积比 2 ∶ 1）的混合溶液中，减压除去有机溶剂，待瓶底形成均匀、透亮的薄膜后加入超纯水，于 28 ℃、180 r/min 条件下恒温振荡，避光水化 1.5 h，采用脂质体挤出器挤压过膜（聚碳酸酯膜孔径分别为 400 和 200 nm，压力 200 MPa）11 次，得到 T**1** 阳离子脂质体（LP-T**1**）和 G**1**T 阳离子脂质体（LP-G**1**T）。另称取蛋黄卵磷脂 70 mg、胆固醇 20 mg、硬脂胺 10 mg，溶解在氯仿和甲醇（体积比 2 ∶ 1）的混合溶液中，减压除去有机溶剂，待瓶底形成均匀、透亮的薄膜后加入超纯水 5 mL（含 **1** 2 mg），水化得 **1** 阳离子脂质体（LP-**1**）。同法制备不含 **1** 的空白阳离子脂质体（LP）。

采用静电吸附法制备 HA 修饰的脂质体。取适量透明质酸钠溶液置试管中，在涡旋条件下将等体积的 LP-G**1**T 溶液逐滴加入 HA 溶液中，混匀后室温放置 1 h，得到 HA 修饰的 G**1**T 阳离子脂质体（LP-G**1**T@HA）。同法制备 HA 修饰的空白阳离子脂质体（LP@HA）。

2.2　G**1**T 分析方法的建立

2.2.1　检测波长

分别称取适量 **1**、T**1**、G**1**T、GA、HA、TPP、ADH，将 **1** 和 HA 溶于去离子水，T**1**、G**1**T、GA、TPP、ADH 则均溶于无水甲醇，配制成一定浓度溶液，分别进行紫外全波长扫描。结果显示 **1** 和 T**1** 均在 480 nm 波长处有最大吸收，G**1**T 在 213 nm 波长处有最大吸收，而 HA、GA、ADH、TPP 在这 2 个波长处均基本无吸收，表明在 480 和 213 nm 处无辅料干扰，因此可将 480 nm 作为 **1** 和 T**1** 的检测波长，213 nm 作为 G**1**T 的检测波长。

2.2.2　线性范围

称取适量 **1** 用去离子水溶解，适量 T**1**、G**1**T 用无水甲醇溶解，分别用对应溶剂稀释成系列质量浓度的溶液，在相应的检测波长处测定吸光度，随后对 **1**、T**1**、G**1**T 作图，得到标准曲线。

以质量浓度 c 为横坐标、吸光度 D 为纵坐标作图，绘制标准曲线。本试验中，**1** 和 T**1** 的质量浓度为 10 ～ 80 μg/mL 时，与吸光度线性关系良好，所得标准曲线方程为 D=0.019 4c+0.010 4（R^2=0.999 4）和 D=0.004 1c − 0.005 8（R^2=0.999 9）；G**1**T 质量浓度为 30 ～ 125 μg/mL 时，与吸光度线性关系良好，所得标准曲线方程为 D=0.008 5c − 0.090 3（R^2=0.994 7）。

2.2.3　精密度和回收率试验

分别配制 30、50 和 100 μg/mL 的 G**1**T 溶液，测定吸光度，重复试验 3 次。结果显示，日内 RSD 分别为 1.51 %、0.44 %、0.51 %，日间 RSD 分别为 1.67 %、0.94 %、0.68 %。平均回收率分别为 (99.81±0.43) %、(100.22±0.25) %和 (98.47±0.36) %，RSD 分别为 0.36%、0.52%和 0.97%。

2.3　包封率测定

取脂质体 200 μL 上样于 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱，用磷酸盐缓冲液（PBS，0.2 mol/L，pH 7.4）洗脱，收集洗脱液。弃去前 3 mL，将之后收集的 4 mL 洗脱液混匀，加甲醇破乳，再按“**2.2**”项下方法检测并计算 $c_{包}$。另取相同体积的脂质体溶液，经甲醇破乳后测定吸光度，计算得到 $c_{总}$。照下式计算包封率和载药量。

$$包封率 = c_{包}/c_{总} \times 100\%$$

$$载药量 = m_e/m_m \times 100\%$$

式中：m_e 和 m_m 分别表示包封于脂质体内的药物质量和载药脂质体的总质量。

最终测得 LP-**1**、LP-T**1**、LP-G**1**T 和 LP-G**1**T@HA 包封率分别为 (80.4±1.1) %、(78.4±0.8) %、(83.8±0.9) %和 (85.4±3.1) %（n=3）；载药量分为 1.58%、3.19%、5.32%和 3.93%（n=3）。

2.4　LP-G**1**T@HA 的粒径及ζ电位

将适量 LP-**1**、LP-T**1**、LP-G**1**T、LP-G**1**T@HA 溶液稀释成一定浓度，测定粒径及ζ电位值，结果如表 1 所示。相比 LP-G**1**T（粒径 218.7 nm，ζ电位 22.8 mV），LP-G**1**T@HA 粒径增至 340.3 nm，ζ电位降至 − 24.5 mV，表明阴离子多糖 HA 成功包裹了 CLs。

2.5　溶血毒性试验

通过溶血试验评价空白脂质体 LP@HA 作为药物载体材料的安全性。参考文献[10]方法，将新鲜兔血（采集自新西兰大白兔）配制成 2%红细胞悬

表 1 不同脂质体的粒径和 ζ 电位测定结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1 Determination Results of Particle Size and ζ Potential of Different Liposomes ($\bar{x}\pm s$, n=3)

脂质体	粒径/nm	PDI	ζ电位/mV
LP-**1**	210.6±1.6	0.158±0.08	46.2±2.7
LP-T**1**	232.9±3.1	0.211±0.12	35.4±2.8
LP-G**1**T	218.7±4.5	0.203±0.07	22.8±1.6
LP-G**1**T@HA	340.3±2.3	0.230±0.11	－24.5±1.5

液，与等体积 LP@HA 溶液（1、2、3、4 和 5 mg/mL）混匀，以生理盐水为阴性对照、蒸馏水为阳性对照。将处理好的样品置 37 ℃水浴中孵育 1.5 h，然后 4 ℃离心（2 415×*g*）10 min，利用酶标仪测定上清液在 540 nm 处的吸光度，计算溶血率。

结果如图 1 所示，当 LP@HA 质量浓度为 1、2、3、4 和 5 mg/mL 时，溶血率分别为 2.1%、2.2%、2.5%、2.9%和 3%，均低于 5%，表明该材料的血液相容性、安全性良好[11]。

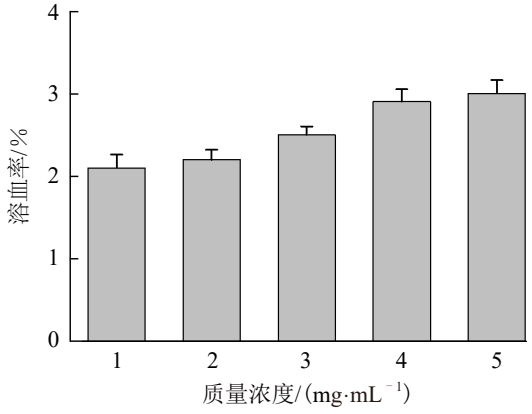


图 1 LP@HA 的溶血率（n=3）

Fig.1 Hemolysis Rates of LP@HA (n=3)

2.6 体外血清稳定性

为考察脂质体进入血液循环后是否能够稳定存在，将 LP-G**1**T 和 LP-G**1**T@HA 分别与含有 50% FBS 的 PBS 混匀并密封，然后在 37 ℃条件下孵育。分别在 0、1、2、4、8、12 和 24 h 时取适量脂质体溶液，稀释后检测其粒径的变化。结果如图 2 所示，在含 50% FBS 的 PBS 中孵育 24 h，LP-G**1**T 的粒径由 225.0 nm 增至 281.7 nm，而 LP-G**1**T@HA 粒径仅由 340.3 nm 增至 342.0 nm，说明 CLs 经 HA 修饰后粒径的稳定性有所提高。

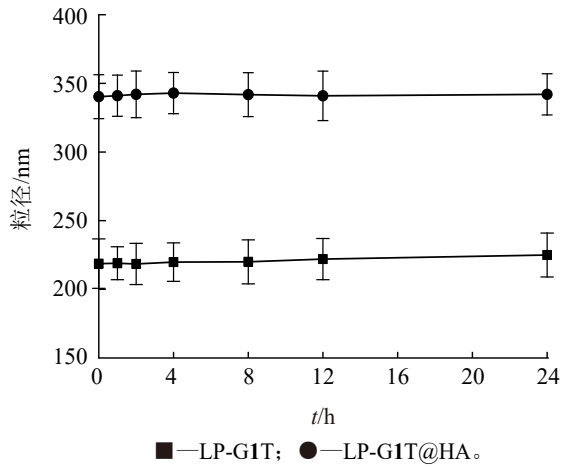


图 2 脂质体在血清中的粒径稳定性（n=3）

Fig.2 Particle Size Stability of Liposomes in Serum (n=3)

2.7 细胞毒性

取对数生长期的 MCF-7 细胞，以每孔 5×10^3 个均匀接种在 96 孔板中，在 5%二氧化碳、37 ℃条件下孵育过夜。分别用含不同质量浓度空白脂质体的培养液或负载药物脂质体的培养液处理细胞 48 h，孵育结束后每孔加入 MTT（5 mg/mL）20 μL，继续在 37 ℃条件下孵育 4 h。弃去培养基，每孔加入二甲基亚砜 150 μL 溶解结晶甲瓒，用酶标仪记录在 490 nm 处的吸光度，计算细胞存活率。

空白脂质体 LP 和 LP@HA 的细胞毒性结果如图 3A 所示，当其质量浓度达 500 μg/mL 时，细胞存活率仍高达 95%，表明 LP 和 LP@HA 对细胞基本无毒。载药脂质体的细胞毒性结果如图 3B 所示，LP-**1**、LP-T**1**、LP-G**1**T、LP-G**1**T@HA 的细胞毒性呈现浓度依赖性。**1** 质量浓度为 0.1、0.5 及 1 μg/mL 时细胞存活率较高，5 和 10 μg/mL 时细胞存活率急剧下降。LP-**1**、LP-T**1**、LP-G**1**T、LP-G**1**T@HA 的 IC_{50} 值分别是 1.50、1.44、1.29、1.05 μg/mL。结果表明，TPP 和 GA 可促进 **1** 对细胞增殖的抑制作用，LP-G**1**T@HA 表现出较强的细胞增殖抑制效果，推测原因是 CD44 介导的细胞摄取效果增强。

2.8 Hoechst 染色

取对数生长期的 MCF-7 细胞，以每孔 3×10^4 个接种于 24 孔板，在 5%二氧化碳、37 ℃条件下孵

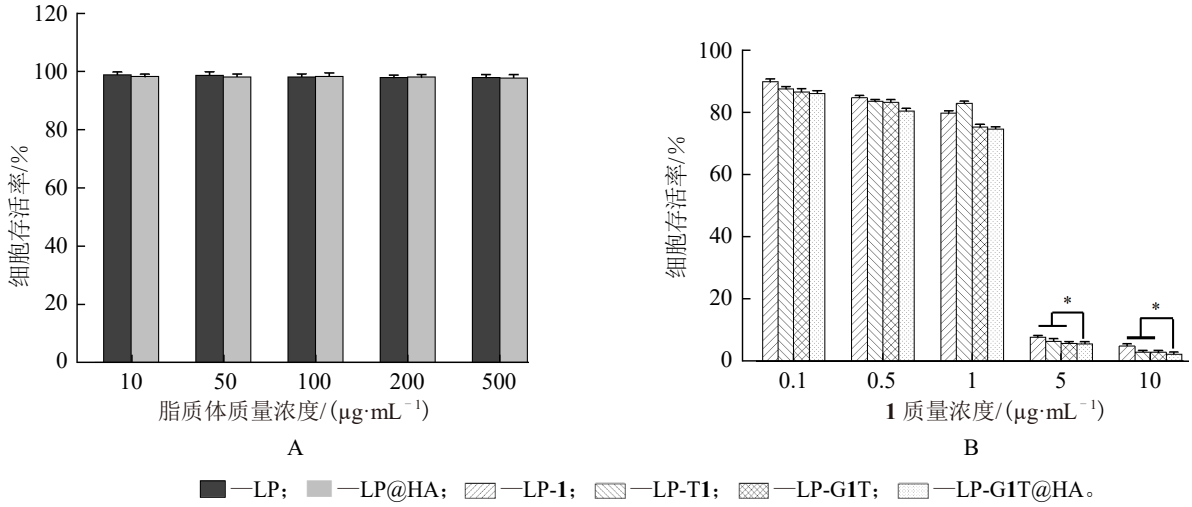


图 3　空白脂质体（A）及不同质量浓度及组分载药脂质体（B）对 MCF-7 细胞的细胞毒性
（与 LP-**1** 或 LP-T**1** 相比，* 表示 $P<0.05$；$n=6$）

Fig.3　Cytotoxicities against MCF-7 Cells of Blank Liposomes (A) and Drug-loading Liposomes with Different Mass Concentrations and Different Compositions (B) (Compared with LP-**1** or LP-T**1**, * Represents $P<0.05$; $n=6$)

育过夜，采用含药培养液（**1** 终质量浓度为 3 μg/mL，同时含 10% FBS）对细胞进行处理，以不加 FBS 的培养基为空白对照。与细胞共同孵育 24 h 后，移除培养液，用 4%多聚甲醛固定细胞，经 PBS 冲洗后采用 Hoechst 33342 染料对细胞核进行染色，在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。结果如图 4 所示，经不同载药脂质体处理后，细胞核出现不同程度的形态变化，包括染色不均匀、部分细胞核出现缝隙（如图中红色箭头所示）等。其中 LP-G**1**T@HA 处理组细胞凋亡情况更明显，说明其诱导细胞凋亡的作用更为显著。

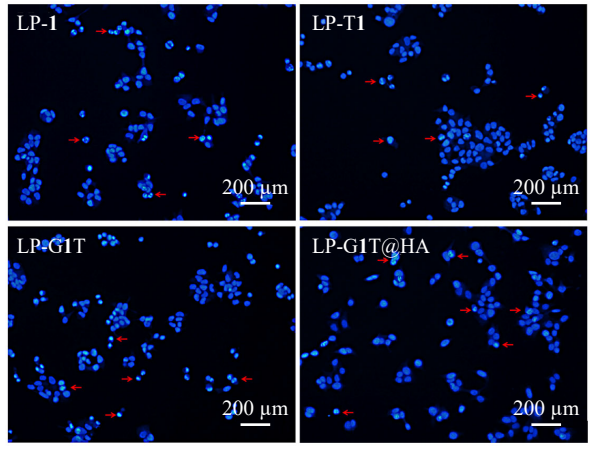


图 4　与不同组分脂质体孵育后 MCF-7 细胞细胞核经 Hoechst 33342 染色的情况（×400）

Fig.4　Nuclear Staining of MCF-7 Cells with Hoechst 33342 Incubated with Liposomes with Different Compositions (×400)

2.9　Caspase 3 活性检测

线粒体中积累的 **1** 可破坏线粒体呼吸链中的成分，启动 Caspase 级联激活，诱导细胞凋亡[12]。取对数生长期的 MCF-7 细胞，以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板，待细胞密度达到 90%后弃去培养液，分别加入含药培养液（**1** 终质量浓度为 3 μg/mL，同时含 10% FBS）处理细胞，以不加 FBS 的培养基为空白对照。在 5%二氧化碳、37 ℃条件下孵育 24 h 后，弃去含药培养液，胰酶消化后收集细胞。根据 Caspase 3 检测试剂盒说明书处理细胞，用酶标仪测定 405 nm 处的吸光度。结果如图 5 所示，以空白对照组 Caspase 3 活性值为 1，进行归一化处理，LP-**1**、LP-T**1**、LP-G**1**T、LP-G**1**T@HA 处理组的 Caspase 3 活性值分别为 1.06、1.24、1.29、1.41。结果与细胞毒性试验结果一致，进一步证实 TPP、GA 和 HA 的修饰可以促进 **1** 诱导细胞凋亡的作用。

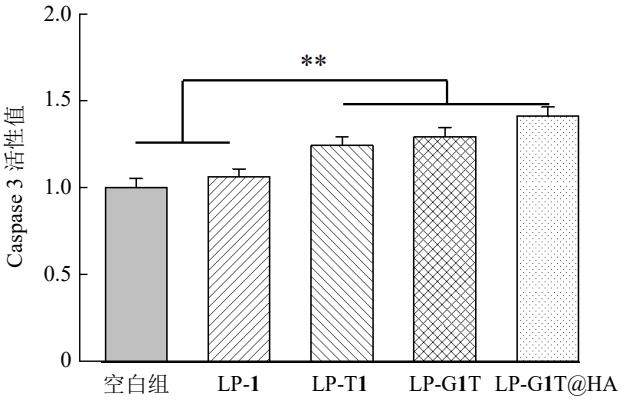


图 5 不同组分脂质体对 MCF-7 细胞 Caspase 3 活性的影响（与 LP-**1** 或 LP-T**1** 相比，** 表示 P<0.01；n=3）

Fig.5 Effects of Liposomes with Different Compositions on Caspase 3 Activity of MCF-7 Cells (Compared with LP-**1** or LP-T**1**, ** Represents P<0.01; n=3)

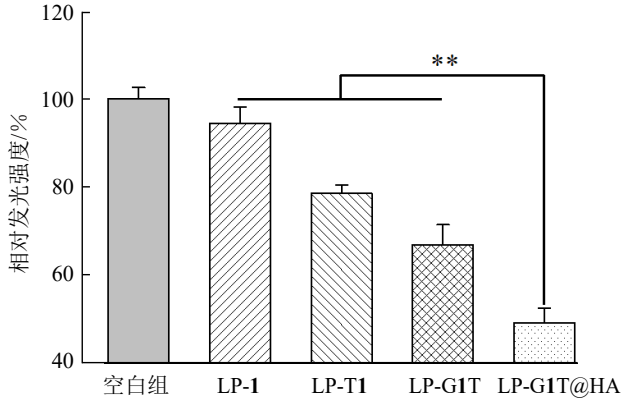


图 6 不同组分脂质体对 MCF-7 细胞内 ATP 含量的影响（与 LP-G**1**T@HA 相比，** 表示 P<0.01；n=3）

Fig.6 Effects of Liposomes with Different Compositions on ATP Content in MCF-7 Cells (Compared with LP-G**1**T@HA, ** Represents P<0.01; n=3)

2.10 ATP 检测

本研究通过测定细胞内的 ATP 含量来确定线粒体功能的完整性。取对数生长期的 MCF-7 细胞，以每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板，培养过夜后除去培养基，分别加入含药培养液（**1** 终质量浓度为 3 μg/mL，同时含 10% FBS），以不加 FBS 的培养基为空白对照。在 5%二氧化碳、37 ℃条件下孵育 24 h 后，弃去培养液，胰酶消化后收集细胞，根据 ATP 检测试剂盒说明书处理细胞，利用酶标仪测定样品发光强度。结果如图 6 所示，LP-**1**、LP-T**1**、LP-G**1**T 处理组发光强度值分别是空白组的 94.3%、78.5%和 67%。LP-G**1**T@HA 处理组 ATP 含量最低，仅为空白组的 49%，说明 LP-G**1**T@HA 对线粒体功能的损害最严重，与之前的试验结论一致。

2.11 MPTP 开放程度测定

MPTP 的开放在增加线粒体通透性、促进化疗药物的线粒体输送及诱导细胞凋亡等方面起着重要作用。取对数生长期的 MCF-7 细胞，以每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板，培养过夜后除去培养基，分别加入含药培养液（**1** 终质量浓度为 3 μg/mL，同时含 10% FBS），以不加 FBS 的培养基为空白对照。在 5%二氧化碳、37 ℃培养箱中孵育 24 h 后，弃去培养液，胰酶消化后收集细胞，根据 MPTP 检测试剂盒说明书处理细胞，使用流式细胞仪测定样品荧光强度。

结果如图 7 所示，与空白对照组相比，经不同组分脂质体处理后，细胞的钙黄绿素（calcein）荧光强度呈不同程度下降，说明各处理组 MPTP 的开放程度不同。与 LP-**1** 组相比，LP-T**1** 诱导的 MPTP 开放程度明显增强，这可能是由于 TPP 修饰在一定程度上增强了化疗药物诱导的线粒体损伤，而将 GA 修饰在 LP-T**1** 上能进一步促进 MPTP 的开放。LP-G**1**T@HA 处理组的荧光强度下降最明显，说明 LP-G**1**T@HA 处理组可最大程度诱导 MPTP 开放、引发线粒体损伤。

3 结论

线粒体作为细胞凋亡的调控中心，其损伤可改变线粒体膜通透性，导致细胞色素 C 等凋亡因子释放，进一步诱导细胞凋亡。传统的线粒体靶向给药策略多基于线粒体膜电位，而直接打开 MPTP 为提高线粒体内的药物浓度提供了一个新的解决思路。本研究利用 CLs 封装 G**1**T，并采用 HA 包裹 CLs，构建了线粒体靶向给药系统 LP-G**1**T@HA。该体系可特异性靶向肿瘤细胞线粒体，触发 MPTP 开放，实现化疗药物向线粒体的高效递送。试验结果表明，LP-G**1**T@HA 粒度分布均匀，表面携带负电荷，药

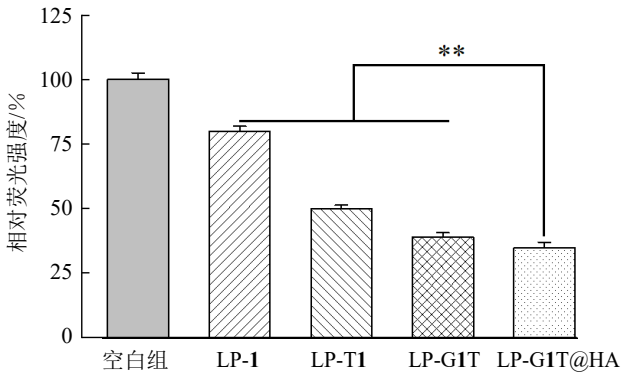


图 7　不同组分脂质体对 MCF-7 细胞中 MPTP 开放性的影响

（与 LP-G**1**T@HA 相比，** 表示 $P<0.01$；$n=3$）

Fig.7　Effect of Liposomes with Different Compositions on MPTP Openness of MCF-7 Cells (Compared with LP-G**1**T@HA, ** Represents $P<0.01$; $n=3$)

物包封率较高，体外血清稳定性良好；体外细胞试验结果表明 LP-G**1**T@HA 可显著抑制细胞增殖，激活线粒体凋亡通路，诱导细胞凋亡。

参考文献：

[1] 陈　航, 胡琴丰, 林　丽, 等. 线粒体移植在心肌缺血损伤治疗中的研究[J]. 自然杂志, 2022, **44**(2): 109-116.

[2] SHAY J W, WERBIN H, FUNK W D, *et al*. Cellular and molecular advances in elucidating p53 function [J]. *Mutat Res*, 1992, **277**(2): 163-171.

[3] WILLETT-BROZICK J E, SAVUL S A, RICHEY L E, *et al*. Germ line insertion of mtDNA at the breakpoint junction of a reciprocal constitutional translocation [J]. *Hum Genet*, 2001, **109**(2): 216-223.

[4] SUNWOO K, WON M, KO K P, *et al*. Mitochondrial relocation of a common synthetic antibiotic: a non-genotoxic approach to cancer therapy [J]. *Chem*, 2020, **6**(6): 1408-1419.

[5] 杨丹琦, 王艳宏, 李洪晶, 等. 基于亲脂性阳离子、线粒体靶向信号肽和己糖激酶修饰的线粒体靶向抗肿瘤制剂的研究进展[J]. 中国药房, 2019, **30**(2): 5.

[6] 叶　琳, 徐凤男, 何　流, 等. 基于三苯基膦修饰的线粒体靶向7-羟基香豆素纳米粒的制备及其性质[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2021, **35**(5): 382-387.

[7] FIORE C, SALVI M, PALERMO M, *et al*. On the mechanism of mitochondrial permeability transition induction by glycyrrhetinic acid [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1658**(3): 195-201.

[8] SPADEA A, RIOS DE LA ROSA J M, TIRELLA A, *et al*. Evaluating the efficiency of hyaluronic acid for tumor targeting via CD44 [J]. *Mol Pharm*, 2019, **16**(6): 2481-2493.

[9] LIU H N, GUO N N, GUO W W, *et al*. Delivery of mitochondriotropic doxorubicin derivatives using self-assembling hyaluronic acid nanocarriers in doxorubicin-resistant breast cancer [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, **39**(10): 1681-1692.

[10] TACHEVA B, PAARVANOVA B, BOZHIKOV S, *et al*. Kinetics of hemolysis induced by thioridazine [J]. *AIP Conf Proc*, 2019, **2186**(1): 110007.

[11] AGARWAL V, GUPTA V, BHARDWAJ V K, *et al*. Hemolytic response of iron oxide magnetic nanoparticles at the interface and in bulk: extraction of blood cells by magnetic nanoparticles [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, **14**(5): 6428-6441.

[12] TANG Q, XIONG W, KE X X, *et al*. Mitochondriaassociated protein LRPPRC exerts cardioprotective effects against doxorubicininduced toxicity, potentially via inhibition of ROS accumulation [J]. *Exp Ther Med*, 2020, **20**(4): 3837-3845.