甘草次酸修饰酶敏感多柔比星脂质体的处方筛选及体外靶向肝癌干细胞作用的评价

孔 亮[1]，郭睿博[1]，张 璐[1]，李学涛[1]*，贾连群[2]*

（1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁大连 116600；2. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室，辽宁沈阳 110847）

摘要：该研究利用薄膜分散 - 硫酸铵梯度法制备甘草次酸（GA）修饰的酶敏感多柔比星（**1**）脂质体（GA-**1**-PVGLIG-Lip），以 **1** 包封率为评价指标，以磷脂与胆固醇（EPC/Chol）质量比、磷脂与 **1**（EPC/**1**）质量比及水化时间为自变量，通过 Box-Behnken 设计 - 响应面法优化处方和工艺。并考察了该脂质体对基质金属蛋白酶 2（MMP-2）的响应能力和对肝癌干细胞（LCSCs）的体外靶向作用。结果显示，优化处方和工艺参数为：EPC/Chol 质量比为 6.88，EPC/**1** 质量比为 27.74，水化时间为 35.12 min。所得优化脂质体的 **1** 平均包封率为（92.58±0.92）%。GA-**1**-PVGLIG-Lip 具有较好的 MMP-2 响应能力，且在 MMP-2 存在时靶向 LCSCs 的能力显著增强。该研究成功制备了 MMP-2 响应性逐级靶向 LCSCs 的脂质体，为肝细胞癌的治疗提供了新策略。

关键词：多柔比星；肝细胞癌；脂质体；甘草次酸；基质金属蛋白酶 2；Box-Behnken 设计；响应面法；靶向；肝癌干细胞

中图分类号：R979.1 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)10-1459-08

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.10.009

Formulation Optimization of Glycyrrhetinic Acid Modified Enzyme Sensitive Doxorubicin Liposomes and Evaluation of Targeting Liver Cancer Stem Cells *in vitro*

KONG Liang[1], GUO Ruibo[1], ZHANG Lu[1], LI Xuetao[1]*, JIA Lianqun[2]*

(*1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600; 2. Key Lab. of Education Ministry on Chinese Medicine Viscera Image Theory and Application, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847*)

ABSTRACT: Glycyrrhetinic acid (GA) modified enzyme sensitive doxorubicin (**1**) liposomes (GA-**1**-PVGLIG-Lip) were prepared by thin film dispersion-ammonium sulfate gradient method. The Box-Behnken design-response surface methodology was used to optimize the formulation and process parameters, with the encapsulation rate of **1** as an index, and the mass ratio of phospholipid-to-cholesterol (EPC-to-Chol), the mass ratio of EPC-to-**1** and the hydration time as independent variables. Then, the response ability of the liposomes to matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and the targeting effect *in vitro* on liver cancer stem cells (LCSCs) were investigated. The results showed that the optimized formulation and process parameters were as follows: EPC-to-Chol mass ratio of 6.88, EPC-to-**1** mass ratio of 27.74, and hydration time of 35.12 min. The average encapsulation rate of the obtained optimal liposomes reached (92.58±0.92)%. In conclusion, the GA-**1**-PVGLIG-Lip had a good MMP-2 response and showed a significant targeting ability to LCSCs in the presence of MMP-2. In this study, MMP-2-responsive liposomes targeting to LCSCs were successfully prepared, which provided a new strategy for hepatocellular carcinoma treatment.

Key Words: doxorubicin; hepatocellular carcinoma; liposome; glycyrrhetinic acid; matrix metalloproteinase 2; Box-Behnken design; response surface methodology; targeting; liver cancer stem cell

肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是常见的恶性肿瘤。统计数据[1—2]显示，2020年其发病率在恶性肿瘤中居第6位，死亡率居第3位，并且在我国的发病率和死亡率远高于世界平均水平。约80%的HCC确诊患者处于进展性阶段，常规治疗方法是全身化疗，但缺少靶向性的化疗药会损伤正常细胞，不良反应严重，且易产生耐药性[3—4]。并且，放疗、化疗等传统治疗策略无法有效杀灭肝癌干细胞（liver cancer stem cells，LCSCs）[5]。LCSCs又称肝癌起始细胞，具有较强的自我更新和分化潜能，可驱动HCC发生，是肿瘤异质性形成的主要原因[6]。此外，LCSCs也被认为是促进肿瘤细胞生长、介导耐药、增加肿瘤转移及复发的“元凶”[7]。因此，开发靶向LCSCs的药物可能是解决目前HCC临床治疗效果不佳、患者预后较差困境的有利策略[8]。

多柔比星（doxorubicin，**1**）是临床一线化疗药物，可用于HCC的治疗，但缺乏靶向性和肿瘤细胞穿透能力，疗效不理想[9]。脂质体作为一种广泛应用的纳米药物载体，可延长体内循环时间，且易通过功能化修饰获得肿瘤靶向性[10]。甘草次酸（glycyrrhetinic acid，GA）受体在HCC细胞中高表达[11]；基质金属蛋白酶-2（matrix metalloproteinase 2，MMP-2）是一种蛋白水解酶，在HCC微环境中大量分布，参与调控HCC的进展。因此，采用MMP-2敏感肽构建MMP-2响应性纳米药物载体，再与GA表面修饰法相结合，有望增加靶向抗肿瘤活性、减少不良反应[12]。

本研究拟构建一种包载**1**的MMP-2响应性逐级靶向脂质体。在该脂质体中，PEG_{5000}位于最外层，形成水化膜包被层以增强EPR效应，同时隐藏主动靶向配体GA，以减少正常肝细胞对**1**的摄取、减轻不良反应。当脂质体到达肝癌细胞周围时，由于微环境中过表达MMP-2，脂质体中的MMP-2敏感肽（Pro-Val-Gly-Leu-Ile-Gly，PVGLIG）会被酶切，使PEG_{5000}水化层脱落，暴露出靶向分子GA，进而通过主动靶向作用增加肝癌细胞的摄取，实现化疗药物的减毒、增效作用。基于此，本研究采用Box-Behnken设计-响应面法优化该脂质体（GA-**1**-PVGLIG-Lip）处方，对包封率、MMP-2响应性以及细胞摄取情况进行初步评价，旨在开发一种安全、有效的抗HCC靶向制剂。

1　仪器与试药

FA1004型电子分析天平（上海越平科学仪器有限公司）；2010AHT型高效液相色谱仪（日本Shimadzu公司）；RE52CS型旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；JY92-2D型超声波细胞破碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；葡聚糖凝胶（Sephadex）G50柱（上海华蓝化学科技有限公司）；Ti-S型倒置荧光显微镜（日本尼康公司）；YA1072型透析袋（截留分子量8 000～14 000，北京索莱宝科技有限公司）；Litesizer 500型纳米粒度及Zeta电位分析仪（奥地利安东帕公司）；FACSCalibur流式细胞仪（美国BD公司）。

1对照品（含量>99%，批号A0823C）、胆固醇（Chol，含量>99%，批号N1018A）、青霉素/链霉素（P/S）均购自大连美仑生物技术有限公司；蛋黄卵磷脂（EPC）、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-甘草次酸（DSPE-PEG_{2000}-GA）、DSPE-PEG_{2000}-PVGLIG-PEG_{5000}、DSPE-PEG_{2000}均购自西安瑞禧生物科技有限公司；MMP-2购于美国Sigma公司；干细胞培养基购自赛业（广州）生物科技有限公司；MEM培养基购自赛百慷（上海）生物技术股份有限公司；0.25%胰蛋白酶、胎牛血清（FBS）均购自美国Gibco公司；CD133抗体购自美国Abcam公司；试验用水为娃哈哈纯净水，其余试剂均为分析纯或色谱纯。

人肝癌细胞（HepG2细胞）购自赛百慷（上海）生物技术股份有限公司。以每1 mL含1×10^6个细胞的密度接种于细胞培养瓶中，采用MEM完全培养基（包含10% FBS、

收稿日期：2023-04-10

基金项目：国家自然科学基金项目（82204629）、中国博士后科学基金项目（2022MD713762）、辽宁省自然科学基金博士科研启动基金项目（2022-BS-197）

作者简介：孔　亮（1990—），男，博士后，讲师，从事新型纳米给药系统的研究。

通信作者：李学涛（1979—），男，教授，博士生导师，从事新型给药系统的研究。

E-mail：lixuetao1979@163.com

贾连群（1975—），女，教授，博士生导师，从事中西医结合基础的研究。

E-mail：jlq-8@163.com

1% P/S)，于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备

采用薄膜分散 - 硫酸铵梯度法制备 GA-**1**-PVGLIG-Lip。

空白脂质体（blank-Lip）的制备：精密称取处方量 EPC、Chol、DSPE-PEG_{2000}、DSPE-PEG_{2000}-GA 和 DSPE-PEG_{2000}-PVGLIG-PEG_{5000} 于 15 mL 离心管中，用甲醇 10 mL 溶解，并转移至 50 mL 圆底烧瓶中，于 40 ℃水浴条件下减压旋转蒸发，待圆底烧瓶底部形成一层薄膜后加入 250 mmol/L 硫酸铵溶液 5 mL，超声水化（功率 20 W，频率 40 kHz）至完全溶解。随后采用超声波细胞破碎机在冰浴条件下超声（功率 500 W，单次超声时间 10 s，停止间隔 5 s）10 min，得乳光样半透明胶体溶液，挤压通过 0.22 μm 微孔滤膜，共 2 次，使脂质体粒度分布均匀。

GA-**1**-PVGLIG-Lip 的制备：取 blank-Lip 于透析袋（截留分子量 8 000 ～ 14 000）中，透析液为 PBS 500 mL，磁力搅拌透析 24 h，每 8 h 更换 1 次透析液。精密称取适量 **1** 对照品，用甲醇溶解，于 40 ℃水浴条件下减压旋转蒸发，至圆底烧瓶底部形成一层薄膜，加入经透析处理的 blank-Lip，40 ℃水浴条件下振摇 20 min，即得 GA-**1**-PVGLIG-Lip。

同法制备不含 DSPE-PEG_{2000}-GA、DSPE-PEG_{2000}-PVGLIG-PEG_{5000} 的 **1**-Lip，以及不含 DSPE-PEG_{2000}-PVGLIG-PEG_{5000} 的 GA-**1**-Lip。

2.2 1 的含量测定

采用 HPLC 法测定样品中 **1** 含量[13]。

色谱条件：色谱柱 Aglient C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 乙腈和 0.02 mol/L 磷酸二氢钠溶液（含 0.45%三乙胺，用磷酸调至 pH 4.0）（体积比 32 ∶ 68）；检测波长 254 nm；流速 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 20 μL。

供试品溶液：取 GA-**1**-PVGLIG-Lip 1 mL，加入甲醇 9 mL，混匀，超声破乳，经 0.45 μm 滤膜过滤，取续滤液，即得。

对照品溶液：精密称取 **1** 对照品 10 mg，用甲醇溶解并制成 1 mg/mL 的 **1** 对照品母液，取母液 100 μL，加入甲醇 900 μL，混合均匀，即得 **1** 质量浓度为 100 μg/mL 的对照品溶液。

空白溶液：取 blank-Lip 1 mL，加入甲醇 9 mL，混匀，超声破乳，经 0.45 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得。

取对照品母液，用适量甲醇逐级稀释制成 **1** 质量浓度为 0.015、0.031、0.062、0.125、0.25 和 0.5 mg/mL 的系列对照品溶液，在上述色谱条件下进样检测，记录色谱图。以 **1** 质量浓度（c）为横坐标、峰面积（A）为纵坐标绘制标准曲线，得标准曲线方程为 $A=2.741\times10^{7}c+1.516\times10^{5}$（$R^2=0.999\ 8$），表明 **1** 质量浓度为 0.015 ～ 1 mg/mL 时与峰面积线性关系良好。本法的专属性、精密度、重复性、稳定性、回收率均符合定量分析试验的要求。

2.3 脂质体包封率的测定

采用葡聚糖凝胶柱法测定脂质体的包封率[14]。取 GA-**1**-PVGLIG-Lip 1 mL，过葡聚糖凝胶柱，洗脱液为 PBS，当流出液变红时开始收集，直至红色乳光样溶液完全流出，将收集液转移至 5 mL 量瓶中，并用 PBS 定容，混匀。精密吸取收集液 500 μL，加入等体积甲醇，超声破乳。另取 GA-**1**-PVGLIG-Lip 1 mL，加入 9 倍量甲醇超声破乳，经 0.45 μm 滤膜过滤。将上述 2 种溶液均按“**2.2**”项下色谱条件进样测定，并计算 **1** 的含量，根据式①计算 **1** 的包封率。

$$包封率=W_1/W_2\times100\% \quad ①$$

式中：W_1 代表 **1** 过柱后的含量，W_2 代表 **1** 过柱前的含量。

2.4 处方优选

本研究采用 Box-Behnken 设计 - 响应面法优化处方[15]。在本课题组前期试验[16]及预试验结果的基础上，选取对 GA-**1**-PVGLIG-Lip 的包封率（Y）有显著影响的 3 个因素，即 EPC 与 Chol 质量比（X_1）、EPC 与 **1** 质量比（X_2）及水化时间（X_3），作为自变量，每个因素设计 3 个水平，如表 1 所示。Box-Behnken 设计方案与结果如表 2 所示。

采用 Design-Expert V8.0.6.1 软件拟合方程，得 $Y=-96.81+8.32X_1+5.47X_2+0.77X_3+0.97X_1X_2+0.21X_1X_3+$

表 1　Box-Behnken 设计的因素与水平

Tab.1　Factors and Levels for Box-Behnken Design

因素	水平		
	－1	0	1
X_1	2	6	10
X_2	10	20	30
X_3/min	10	30	50

表 2　Box-Behnken 设计的方案与结果

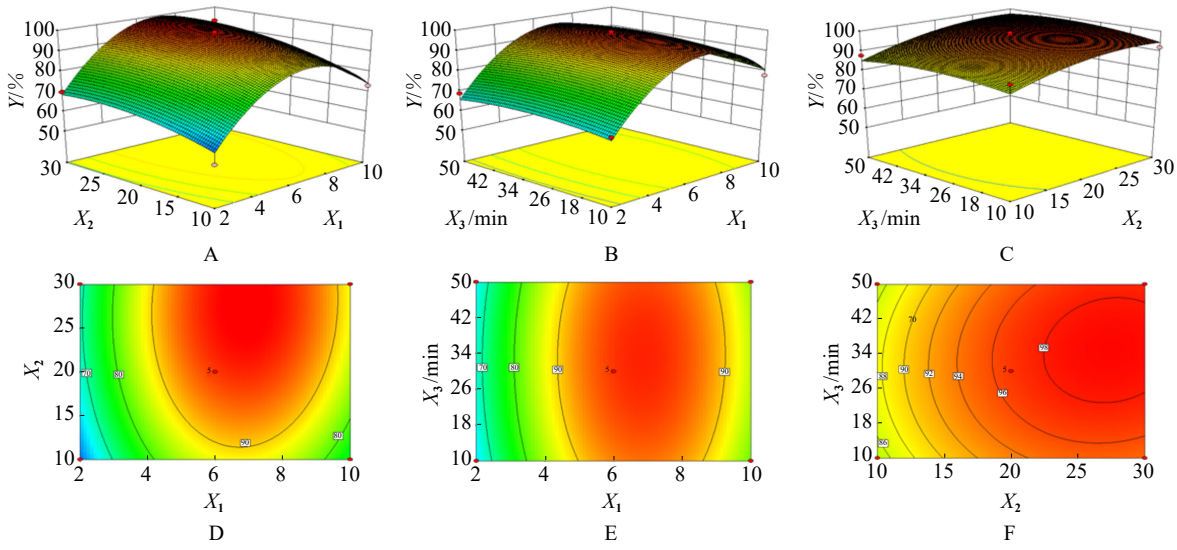
Tab.2　Scheme and Results of Box-Behnken Design

编号	X_1	X_2	X_3	Y/%
1	0	0	0	94.47
2	0	0	0	96.66
3	－1	0	1	68.81
4	0	1	1	93.10
5	0	0	0	95.52
6	－1	0	－1	66.09
7	0	0	－1	91.84
8	1	－1	0	73.04
9	0	0	0	99.12
10	0	0	0	98.27
11	0	－1	1	87.51
12	0	－1	－1	89.05
13	0	0	－1	77.90
14	－1	1	0	69.77
15	1	0	1	81.46
16	－1	－1	0	53.52
17	1	0	0	92.78

$0.65X_2X_3 - 20.65X_1^2 - 3.79X_2^2 - 2.60X_3^2$（$r$=0.973 5，$P$<0.001）。结果显示，该方程拟合度较好，可用来分析和预测脂质体的制备工艺。对上述拟合模型进行显著性检验，结果显示，X_1、X_2、X_1^2 项对脂质体的包封率影响显著（P<0.05）；而其他项对脂质体包封率的影响不显著（P>0.05）。

利用 Design-Expert V8.0.6.1 软件作三维响应面图和等高线图，结果如图 1 所示。X_1 和 X_2 对 Y 值影响较为显著，而 X_3 对 Y 值影响不显著，且 3 个因素对 Y 值影响程度为 X_1>X_2>X_3。通过该模型拟合得到脂质体的优化参数为：X_1=6.88，X_2=27.74，X_3=35.12。结合本实验室考察脂质体处方的经验，最终确定脂质体的优化处方（当脂质体体积为 5 mL 时）为：EPC 24 mg，Chol 3.5 mg，**1** 1.16 mg，DSPE-PEG$_{2000}$、DSPE-PEG$_{2000}$-GA 和 DSPE-PEG$_{2000}$-PVGLIG-PEG$_{5000}$ 各 2 mg，水化时间为 35 min。

根据上述优化处方制备 3 批 GA-**1**-PVGLIG-Lip，照“**2.3**”项下方法测定包封率。结果表明，3 批脂质体样品中 **1** 的平均包封率为（92.58±0.92）%，与预测值 93.94% 的相对误差为 1.36%，提示本研



A—因素 X_1 和 X_2 影响 Y 的响应面图；B—因素 X_1 和 X_3 影响 Y 的响应面图；C—因素 X_2 和 X_3 影响 Y 的响应面图；D—因素 X_1 和 X_2 影响 Y 的等高线图；E—因素 X_1 和 X_3 影响 Y 的等高线图；F—因素 X_2 和 X_3 影响 Y 的等高线图。

图 1　各因素对脂质体包封率的影响

Fig.1　Effects of Various Factors on Encapsulation Efficiency of the Liposomes

究优选的脂质体处方工艺稳定、方法可行。

2.5 MMP-2 响应性评价

采用 MMP-2 敏感肽降解试验考察 GA-**1**-PVGLIG-Lip 的酶敏感性[17]。向 MMP-2 中加入 PBS 1 mL，配制成 500 μg/mL 的 MMP-2 母液。随后，向脂质体溶液中添加 PBS 或 MMP-2 母液（MMP-2 终质量浓度 5 μg/mL），置 37 ℃培养箱中孵育 2 h。采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪检测脂质体的尺寸收缩情况，以评价其刺激响应性行为，粒径检测每次设定循环 10 次，电位检测每次设定循环 1 000 次，每种脂质体重复 3 次。结果显示，当加入 PBS 时，GA-**1**-PVGLIG-Lip 的平均粒径为（119.69±4.08）nm，而加入 MMP-2 溶液后 GA-**1**-PVGLIG-Lip 的平均粒径缩小为（92.47±0.59）nm，说明 GA-**1**-PVGLIG-Lip 中的酶敏感多肽 PVGLIG 对 MMP-2 的响应较灵敏。

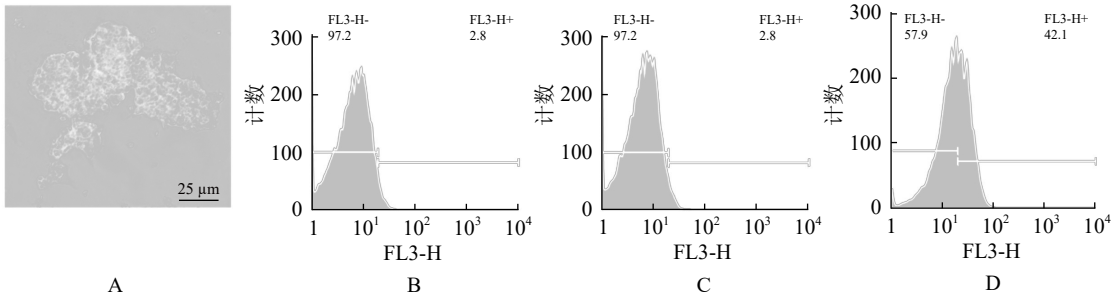
2.6 脂质体对 LCSCs 的靶向性考察

LCSCs 诱导：将 HepG2 细胞以每 1 mL 含 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中，采用干细胞培养基（包含 2% B27 补充剂、20 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、20 ng/mL EGF 和 1%谷氨酰胺）诱导为 LCSCs，并采用流式细胞仪进行鉴定。

取 6 孔板中培养的 LCSCs，4 ℃离心（560×*g*）5 min，弃去培养基，剩余物用 PBS 洗 2 遍，再用 PBS 500 μL 重悬。同时收集 HepG2 细胞，用 0.25%胰蛋白酶消化 2 min，加入完全培养基中止消化，其余步骤同上。取上述细胞悬液 500 μL，分别加入 Anti-CD133 抗体 5 μL，4 ℃避光孵育过夜。另取 LCSCs 细胞，加入 PBS（不含 CD133 抗体）作为空白对照组。次日，4 ℃离心（560×*g*）5 min，沉淀用 PBS 洗 2 次，再用 PBS 300 μL 重悬，采用流式细胞仪测定 $CD133^+$ LCSCs 比例[18]，结果如图 2 所示。显微镜观察可见细胞呈球状，悬浮生长，细胞结构完整，且诱导后的细胞球上 CD133 阳性表达率为 40%以上，明显高于 HepG2 细胞，说明 LCSCs 诱导成功。

2.7 脂质体对 LCSCs 的摄取量考察

将 LCSCs 以每 1 mL 含 2×10^4 个细胞的密度接种于 24 孔板中，待其形成细胞球后，向细胞中分别加入 blank-Lip、**1**-Lip、GA-**1**-Lip、GA-**1**-PVGLIG-Lip 及 GA-**1**-PVGLIG-Lip+MMP-2（**1** 的终浓度均为 10 μmol/L），置 37 ℃培养箱中孵育 2 h。另取一组 LCSCs，先加入终质量浓度为 5 μg/mL 的 MMP-2 溶液，然后加入 GA-**1**-PVGLIG-Lip（**1** 的终浓度为 10 μmol/L），置 37 ℃培养箱孵育 2 h。然后，分别小心吸弃各组细胞的上清液，剩余物用 4%多聚甲醛固定，4',6- 二脒基 -2 苯基吲哚（DAPI）染色 10 min，再用 PBS 洗去多余溶液，于倒置荧光显微镜下观察各组细胞的荧光强度，并利用 Image J V1.8.0 软件进行半定量分析。结果如图 3 所示，blank-Lip 组细胞内未观察到红色荧光，而其余含 **1** 脂质体组均可观察到明显的红色荧光。其中，**1**-Lip 组细胞中的荧光强度较弱，可能是由于未修饰主动靶向分子 GA，细胞摄取 **1** 仅依靠被动靶向作用的原因；GA-**1**-PVGLIG-Lip 组细胞中的荧光强度亦较



A—LCSCs 显微镜图片（×400）；B—空白对照组；C—HepG2 组；D—LCSCs 组。

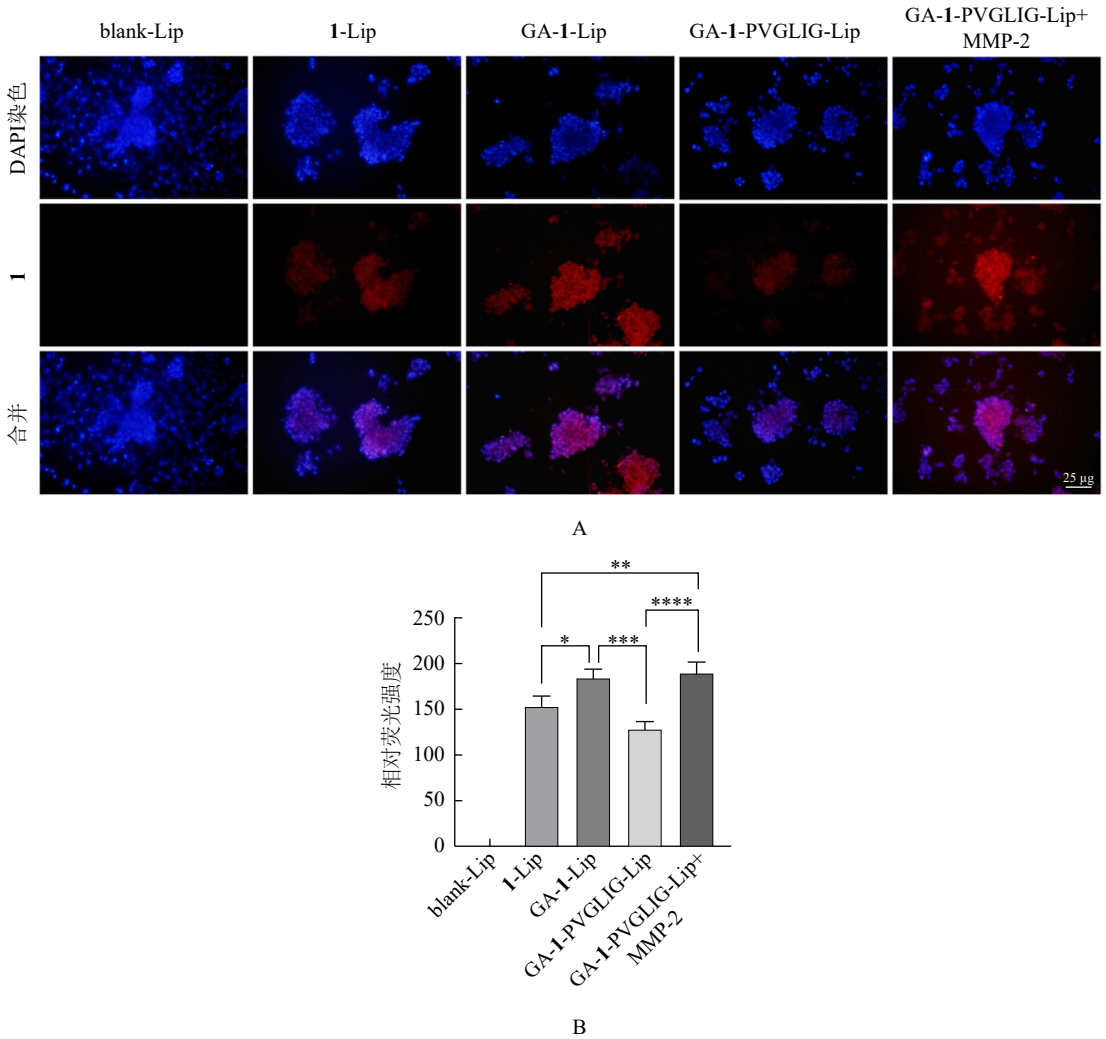
图 2 LCSCs 显微照片及流式细胞分析结果

Fig.2 Micrograph of LCSCs and Results of Flow Cytometry Analysis

弱，可能是由于修饰了 PEG_{5000} 水化层，脂质体粒径变大，并且主动靶向分子 GA 被隐藏，细胞摄取效率低；GA-**1**-Lip 组细胞摄取量较高，可能是通过主动靶向分子 GA 介导的内吞作用实现的；而当培养基中添加了 5 μg/mL 的 MMP-2 溶液后，GA-**1**-PVGLIG-Lip 的细胞摄取显著增加，与 GA-**1**-Lip 组的 **1** 细胞摄取量基本相同。经统计分析表明，不同脂质体制剂对于 LCSCs 的主动靶向性排序由强至弱分别为：GA-**1**-Lip ≈ GA-**1**-PVGLIG-Lip+MMP-2>**1**-Lip ≈ GA-**1**-PVGLIG-Lip。

3　讨论

HCC 微环境对肿瘤的增殖、侵袭和转移起到关键调控作用。MMPs 是 HCC 微环境中重要的组成成分，属于一类内切蛋白水解酶。MMP-2 是 MMPs 家族中的重要一员，其高表达可导致细胞外基质、血管基底膜的降解速度加快，进而导致肿瘤细胞向相邻组织侵袭、转移[19]。有研究[20]表明，MMP-2 除在 HCC 基质中高表达以外，在正常细胞和组织中也发挥着至关重要的作用。因此，若采用 MMP-2 抑制剂作为敏感键会引起一系列不良反应。



A—各制剂的细胞摄取荧光照片；B—各组的相对荧光强度（两两比较：* 表示 $P<0.05$，** 表示 $P<0.01$，*** 表示 $P<0.001$，**** 表示 $P<0.000\,1$；$n=3$）。

图 3　LCSCs 对不同脂质体的摄取情况分析

Fig.3　Analysis of Cellular Uptake of a Various of Liposomes by LCSCs

本研究采用 PVGLIG 肽作为敏感键，该肽只含有 MMP-2 特异性酶切位点，特点是不影响 MMP-2 的功能与表达。在肿瘤微环境中，该肽可与 MMP-2 特异性结合并发生水解[21]，适于构建一种酶响应性逐级靶向脂质体，提高药物归巢的准确性。

本研究首先采用 Box-Behnken 设计 - 响应面法优化 GA-**1**-PVGLIG-Lip 处方，所得优化处方为：处方量为 5 mL 时，含 EPC 24 mg、Chol 3.5 mg、**1** 1.16 mg，以及 DSPE-PEG_{2000}、DSPE-PEG_{2000}-GA 和 DSPE-PEG_{2000}-PVGLIG-PEG_{5000} 各 2 mg。为了考察该脂质体的智能响应能力，向脂质体中加入 5 μg/mL 的 MMP-2 溶液。结果显示，当 GA-**1**-PVGLIG-Lip 与 MMP-2 溶液共孵育后，脂质体粒径显著缩小，说明 PVGLIG 敏感肽被 MMP-2 水解断裂，致使 PEG_{5000} 层脱离脂质体内核，暴露出主动靶向分子 GA，从而实现尺寸收缩与逐级靶向。细胞摄取试验结果显示，单独使用 GA-**1**-PVGLIG-Lip 处理，细胞摄取较少，而当加入 5 μg/mL 的 MMP-2 溶液后，GA-**1**-PVGLIG-Lip 的细胞摄取显著增强，证明该脂质体具有智能响应 MMP-2 高表达的 HCC 微环境的潜力。

综上所述，本研究成功制备了包封率较高、具有 MMP-2 特异性响应能力的 **1** 逐级靶向脂质体，优化了该脂质体的处方，并初步证明其能够显著增加 LCSCs 的摄取，具有主动靶向 LCSCs 的潜能，给 HCC 的治疗带来了新的希望；但其具体的抗 HCC 疗效与作用机制仍需要进一步研究。

参考文献：

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, **71**(3): 209-249.

[2] TAN D J H, NG C H, LIN S Y, *et al*. Clinical characteristics, surveillance, treatment allocation, and outcomes of non-alcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2022, **23**(4): 521-530.

[3] FORNER A, LLOVET J M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2012, **379**(9822): 1245-1255.

[4] ASGHAR U, MEYER T. Are there opportunities for chemotherapy in the treatment of hepatocellular cancer? [J]. *J Hepatol*, 2012, **56**(3): 686-695.

[5] LEE T K W, GUAN X Y, MA S. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma-from origin to clinical implications [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, **19**(1): 26-44.

[6] LIU Y C, YEH C T, LIN K H. Cancer stem cell functions in hepatocellular carcinoma and comprehensive therapeutic strategies [J]. *Cells*, 2020, **9**(6): 1331.

[7] ZHENG H P, POMYEN Y, HERNANDEZ M O, *et al*. Single-cell analysis reveals cancer stem cell heterogeneity in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2018, **68**(1): 127-140.

[8] WANG Z, SUN M, LI W, *et al*. A novel CD133- and EpCAM-targeted liposome with redox-responsive properties capable of synergistically eliminating liver cancer stem cells [J]. *Front Chem*, 2020, **8**: 649.

[9] MERLE P, BLANC J F, PHELIP J M, *et al*. Doxorubicin-loaded nanoparticles for patients with advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib treatment failure (RELIVE): a phase 3 randomised controlled trial [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, **4**(6): 454-465.

[10] LIN H, SUN F J, LI T T, *et al*. Disulfiram enhances chemotherapeutic effects of doxorubicin liposomes against human hepatocellular carcinoma via activating ROS-induced cell stress response pathways [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2022, **90**(6): 455-465.

[11] SANG L H, LI J, ZHANG F X, *et al*. Glycyrrhetinic acid modified chlorambucil prodrug for hepatocellular carcinoma treatment based on DNA replication and tumor microenvironment [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, **220**: 112864.

[12] KONG L, ZHANG S M, CHU J H, *et al*. Tumor microenvironmental responsive liposomes simultaneously encapsulating biological and chemotherapeutic drugs for enhancing antitumor efficacy of NSCLC [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, **15**: 6451-6468.

[13] 蔡馥伊, 姚雪敏, 荆 鸣, 等. 穿膜肽修饰多功能靶向阿霉素脂质体处方优选及理化性质研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, **23**(6): 37-41.

[14] 姚雪敏, 荆 鸣, 蔡馥伊, 等. 穿膜肽GGPFV修饰的柔红霉素/薯蓣皂苷脂质体的处方优化及细胞毒性研究[J]. 中国

药房, 2020, **31**(21): 2579-2584.

[15] 王毅云, 慕宏杰, 华红臣, 等. 贝伐单抗多囊脂质体的处方优化及体外释放特性研究[J]. 中国药房, 2018, **29**(7): 922-926.

[16] 李学涛, 王　为, 符　敏, 等. 穿膜肽修饰表阿霉素与五味子乙素脂质体的处方优选及细胞毒性评价[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, **22**(1): 8-11.

[17] ZHU L, KATE P, TORCHILIN V P. Matrix metalloprotease 2-responsive multifunctional liposomal nanocarrier for enhanced tumor targeting [J]. *ACS Nano*, 2012, **6**(4): 3491-3498.

[18] MAO X L, LIU J J, GONG Z R, *et al*. iRGD-conjugated DSPE-PEG2000 nanomicelles for targeted delivery of salinomycin for treatment of both liver cancer cells and cancer stem cells [J]. *Nanomedicine* (Lond), 2015, **10**(17): 2677-2695.

[19] SCHEAU C, BADARAU I A, COSTACHE R, *et al*. The role of matrix metalloproteinases in the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma [J]. *Anal Cell Pathol* (Amst), 2019, **2019**: 9423907.

[20] LI R T, WU W, LIU Q, *et al*. Intelligently targeted drug delivery and enhanced antitumor effect by gelatinase-responsive nanoparticles [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(7): e69643.

[21] RAMEZANI P, ABNOUS K, TAGHDISI S M, *et al*. Targeted MMP-2 responsive chimeric polymersomes for therapy against colorectal cancer [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, **193**: 111135.

