

【实验研究】

外泌体携载阿霉素递送体系构建及体外抗肿瘤活性评价

周菲¹, 曲姣蓉¹, 刘闰平², 李雅静¹, 李晓骄阳^{1*}

1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

摘要: **目的** 制备肝癌细胞Hep1-6外泌体并对化疗药物阿霉素(DOX)进行包载,以期实现对肿瘤细胞更高的靶向活性与杀伤作用。**方法** 采用梯度离心法对肿瘤细胞Hep1-6来源的外泌体进行制备分离;采用透射电镜技术、表面标记蛋白表征以及纳米颗粒追踪分析技术对外泌体的形态、特征蛋白、粒径分布和浓度进行表征;采用电穿孔方法实现外泌体对DOX的有效包载,制备包载阿霉素外泌体(EXO_{DOX})。采用CCK-8法检测EXO_{DOX}与DOX(0.5、1、2、3、5、10 μg·mL⁻¹)体外对Hep1-6细胞增殖的影响,采用激光共聚焦显微镜观察体外Hep1-6细胞对EXO_{DOX}与DOX(1 μg·mL⁻¹)的靶向摄取作用。**结果** 所制备的外泌体具有形态良好、粒度均一的特性且具备外泌体特征膜蛋白CD63、CD81、肿瘤易感基因101(TSG101)的表达;在电穿孔条件为150 V和75 μF下外泌体对DOX具备良好的包载特性;相比于单独给药DOX,在同等质量浓度下EXO_{DOX}对Hep1-6细胞增殖抑制作用显著增强($P < 0.05$ 、 0.01),同时肿瘤细胞对EXO_{DOX}的摄取更具靶向性。**结论** 制备的EXO_{DOX}较DOX具有更强的体外细胞毒活性,EXO_{DOX}表现出对肿瘤细胞更高的靶向特性。

关键词: 阿霉素; 外泌体; 靶向给药; 肝癌; 药物递送; 细胞增殖; 摄取

中图分类号: R945; R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)05-0976-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.05.007

Construction of tumor-derived exosome delivery system loaded with doxorubicin and its antitumor activity *in vitro*

ZHOU Fei¹, QU Jiaorong¹, LIU Runping², LI Yajing¹, LI Xiaojiaoyang¹

1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To extract exosomes from hepatoma cells Hep1-6 and carry out effective inclusion of doxorubicin (DOX) as a chemotherapy drug to achieve higher targeting activity and killing effect on tumor cells. **Methods** Gradient centrifugation was used to prepare and isolate exosomes from tumor cells. The morphology, characteristic marker protein, particle size distribution and concentration of exosomes were characterized by transmission electron microscopy, Western blotting and nanoparticle tracking analysis (NTA). Exosomes were effectively loaded with doxorubicin by electroporation to prepare exosomes-doxorubicin (EXO_{DOX}). The tumor killing activity and targeted uptake of EXO_{DOX} and DOX (0.5, 1, 2, 3, 5, 10 μg·mL⁻¹) were evaluated by CCK-8 and laser confocal assay. **Results** EXO_{DOX} with good morphology and uniform particle size were prepared with the expression of the characteristic membrane proteins of exosomes, such as CD63, CD81, and TSG101. The exosomes have good encapsulation characteristics for DOX under 150 V and 75 μF electroporation condition. Compared with DOX alone, EXO_{DOX} achieve efficient targeted uptake of tumor cells at the same dose, and further improve the killing effect on tumor cells. **Conclusions** EXO_{DOX} achieve higher targeting characteristics and stronger cytotoxic activity against tumor cells.

Key words: doxorubicin; exosome; targeted drug delivery; liver cancer; drug delivery; cell proliferation; uptake

收稿日期: 2023-03-14

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目(7212174)

第一作者: 周菲, 博士研究生, 研究方向为靶向肿瘤的干预治疗。E-mail: zfl16318@163.com

*通信作者: 李晓骄阳, 教授, 博士生导师, 研究方向为抗肝纤维化相关中药药理。E-mail: xiaojiaoyang.li@bucm.edu.cn

肝癌是全球范围内导致癌症相关死亡的第2大原因,且目前其发病率和死亡率仍呈现逐年攀升的趋势,每年新增人数多达90万人^[1],5年生存率仅为5%~30%^[2],严重危害了人类生命健康。目前,我国的肝癌发病率居于世界之首,在全球新发肝癌病例中占比达55%^[3-4],严重威胁人类生命健康,因此,探索精准有效的抗肝癌策略具有重要的研究价值^[5]。

目前肝癌的临床治疗主要聚焦于手术、放化疗、分子靶向治疗及免疫治疗等策略,这些方法在肝癌治疗中发挥着重要作用,但仍存在诸多问题,如预后较差、生物相容性较低以及肿瘤响应性较弱^[6-7]。在肝癌治疗中,多种人造纳米药物载体如脂质体药物、聚合物纳米颗粒等被广泛用于药物递送过程,实现了对肝癌的有效靶向和抑制作用^[8-10]。然而,此类人造药物载体在其应用过程中往往被发现具有潜在的毒性、免疫原性以及相对不高的肿瘤靶向能力^[11-12]。近年来,仿生纳米载体被认为在药物递送领域具有不可替代的优势,且具有高效的载药能力。其中,外泌体属于细胞分泌的粒径在30~150 nm的双层脂质囊泡,其内部往往含有多种生物分子如蛋白质、脂质、DNA以及多种类型RNA等,被广泛认为是细胞间交流的重要传播媒介^[13-14]。外泌体具备较高的膜渗透性同时可以穿透血脑屏障,具有优异的生物相容性以及“归巢”至其分泌细胞的特性,是治疗各种疾病的有效候选载体^[15-16]。

肿瘤细胞来源的外泌体近年来被广泛用于癌症治疗,其具有多种独特优势例如优异的同源靶向特性及低排异性。同时,肿瘤细胞往往可产生大量外泌体,借助其快速增殖特性可以实现对于外泌体的快速大量提取^[17-18]。Qiao等^[19]报道来自HT1080纤维瘤细胞的外泌体可以实现在HT1080细胞的高效积聚,且在体内验证了其在HT1080细胞异种移植小鼠肿瘤内部含量显著高于HeLa细胞分泌外泌体在该肿瘤内的水平。此外,Liu等^[20]提取4T1乳腺癌细胞的外泌体并包载了光敏剂华卞啉钠,实现了对同型肿瘤的有效靶向和抑制活性,且在肿瘤部位进行光动力治疗实现了药物可控释放以及活性氧(ROS)的生成,在癌症治疗和诊断方面均展现出突出优势。阿霉素(DOX)是一种广谱抗癌药物,在临床上被用于肝癌治疗,但是药物往往对患者正常组织也有损伤,在临床上会出现严重的不良反应,因此,选择安全无毒的生物材料提高DOX的靶向递送也是目前的研究热点^[21]。基于上述背景,本研究

将从肝癌细胞Hep1-6中提取分离外泌体进行表征,将其作为化疗药物DOX的递送载体,并对该方法进行优化,同时进一步探究其体外抗肿瘤特性以及肿瘤靶向能力,为临床肝癌的靶向治疗提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Scientific超高速离心机、TH641吊篮式离心转子(赛默飞世尔科技公司);贝克曼13.2 mL薄壁超速离心管(贝克曼库尔特有限公司);SARRORIUS-BS124S型电子分析天平(德国赛多利斯股份有限公司);移液枪[艾本德(Eppendorf)中国有限公司];涡旋混合器、掌上离心机(武汉赛维尔生物科技有限公司);电泳仪、电转仪、ChemiDoc MP化学发光凝胶成像系统(伯乐生命医学产品上海有限公司);酶标仪(赛尔福医疗科技北京有限公司);Olympus FV3000激光共聚焦显微镜(奥林巴斯株式会社);ZetaView颗粒电位滴定及粒度分析仪(德国Particle Metrix公司);透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

1.2 药品与试剂

盐酸阿霉素(货号:S17092,质量分数:98%,上海源叶生物科技有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS,武汉赛维尔生物科技有限公司);BI胎牛血清、BI-DMEM培养基(以色列生物科技公司 Biological Industries);青链霉素混合液(100×,青霉素10 kU·mL⁻¹,链霉素10 mg·mL⁻¹);胰酶(南京凯基生物科技发展有限公司);CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);RIPA裂解液、蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE聚丙烯酰胺(武汉赛维尔生物科技有限公司);四甲基乙二胺(TEMED,生工生物工程股份有限公司);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,上海尚宝生物科技发展有限公司)。CD63抗体(货号:ab216130)购自于Abcam公司;CD81抗体(货号:10037S)和 β -actin(货号:4970s)购于Cell Signaling Technology公司;肿瘤易感基因101(TSG101)抗体(货号:sc-7964)购自于Santa Cruz公司。

1.3 细胞

Hep1-6小鼠肝癌细胞,购于美国典型菌种保藏中心(ATCC)细胞库。

2 方法

2.1 外泌体的制备

对数生长期的肝癌细胞Hep1-6,采用超大皿进行培养并在细胞密度达到80%~90%时,更换为不含血清的培养基,48 h后收集培养基,采用梯度离心

液收集外泌体。具体步骤为:首先 $2\,000\times g$ 离心15 min,吸上清至新的离心管,下层沉淀(细胞碎片)弃去。将收集的培养基转移到超速离心管,于超速离心机 $16\,000\times g$ 离心30 min,后收集上清,下层沉淀弃去。上清培养基于超速离心机 $100\,000\times g$ 离心90 min,小心弃去上清培养基,加满PBS继续于超速离心机 $100\,000\times g$ 离心90 min,弃去上清并PBS重悬离心在管底的外泌体,即得外泌体悬液。

2.2 外泌体的透射电镜形态学考察

采用负染法在透射电镜下观察制备的外泌体的形态。用移液枪吸取 $10\ \mu\text{L}$ 外泌体悬液,滴加到碳膜铜网上,室温下放置1 min后,采用滤纸吸去浮液后继续在室温下静置30 min。其后吸取 $10\ \mu\text{L}$ 的2%醋酸双氧铀对外泌体进行负染,时间为20 min,用去离子水洗滌后在透射电镜下观察外泌体形态。

2.3 外泌体的纳米颗粒追踪分析

外泌体的粒径大小以及粒子数目及分布采用纳米颗粒追踪分析技术(NTA)进行分析。选择ZetaView颗粒电位滴定及粒度分析仪,其主要依据激光光源照射纳米颗粒悬浮液,并对纳米颗粒的散射光进行检测,通过统计散射颗粒的数量来计算纳米颗粒浓度。与此同时追踪纳米颗粒布朗运动轨迹,计算单位时间间隔的均方位移并计算力度分布。将初始提取的外泌体悬液,用PBS稀释5倍后进行浓度测定,稀释外泌体浓度在 $1\times 10^7\sim 1\times 10^9$ 粒 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 为合适区间,否则可根据浓度继续稀释再进行测定;采用Zetaview软件通过统计散射颗粒的数量来计算纳米颗粒浓度,Zetaview会自动对每10秒为1段的视频进行记录(共3段),并进一步分析得出相应参数。

2.4 外泌体的特征蛋白Western blotting验证

对制备的外泌体进行BCA蛋白水平定量,将外泌体(1个超大皿来源,重悬在 $100\ \mu\text{L}$)在RIPA蛋白裂解液($100\ \mu\text{L}$)处理15 min后, $8\,000\times g$ 离心5 min后采用BCA法检测蛋白质量浓度,根据质量浓度选择 $30\ \mu\text{g}$ 蛋白上样,采用SDS-PAGE分离蛋白,电泳电压为80 V,压平后调整为120 V。其后采用PVDF膜进行湿转,恒流320 A,并且保证电压在85~130 V,根据蛋白相对分子质量控制湿转时间,后采用5%脱脂奶粉在室温摇床上进行封闭,封闭1 h后,采用TBST洗净后加入一抗(CD63、TSG101、CD81和 β -actin,抗体比例均为1:2 000)封闭过夜。第2天用TBST摇床洗滌3次,每次7 min,加入对应二抗(抗体比例1:10 000)孵育2 h, TBST摇床洗滌3次,每

次7 min,后加入4 mL ECL发光液,在曝光仪进行检测拍照。

2.5 包载阿霉素外泌体(EXO_{DOX})的制备

取所制备的外泌体 $100\ \mu\text{g}$ 混悬在 $20\ \mu\text{L}$ 的PBS中,后加入 $50\ \mu\text{g}$ 的DOX(采用三乙胺脱盐),并 $4\ ^\circ\text{C}$ 预冷,与此同时 $0.4\ \text{cm}$ 电转杯同样置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 预冷。将外泌体-药物混合液加入到电转缓冲液,选择体积为 $200\ \mu\text{L}$ 的电转缓冲液,不同电压(350、200、150 V)在电转仪下进行电转,模式选择Exponential Protocol,在仪器选择对应电转杯型号,点击ENTER后几毫秒即电转完成,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育30 min使外泌体恢复。其后观察外泌体溶液,如外泌体受破坏则会形成沉淀,以此评估电转效果,后在超速离心机下 $100\,000\times g$ 离心90 min,收集下层沉淀为EXO_{DOX}。

2.6 EXO_{DOX}对Hep1-6细胞增殖的影响

采用CCK-8法评估EXO_{DOX}和DOX溶液对肝癌细胞Hep1-6活力的影响。将Hep1-6细胞悬液以每孔 1×10^4 的密度接种于96孔板中,每孔 $100\ \mu\text{L}$,培养12 h后进行给药,分别加入DOX(0.5 、 1 、 2 、 3 、 5 、 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和EXO_{DOX}(0.5 、 1 、 2 、 3 、 5 、 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),左上角孔加入triton X-100,培养箱孵育24 h。取CCK-8母液,用含1%血清培养基稀释成10%的CCK-8溶液,将96孔板取出,倒掉培养基,每孔加 $100\ \mu\text{L}$ 10% CCK-8溶液,周围一圈用空白培养基进行液封,置于培养箱孵育30 min,可观察到明显颜色变化(橙色)后于酶标仪450 nm波长下测定吸光度(A)值,不同质量浓度下取平均值,并计算细胞存活率。空白组为triton X-100处理,对照组为不含药培养基处理。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.7 肝癌细胞Hep1-6对EXO_{DOX}的摄取情况

采用共聚焦显微镜观察肝癌细胞Hep1-6对EXO_{DOX}和DOX的摄取情况。将Hep1-6细胞悬液以每皿 1×10^5 的密度接种于共聚焦小皿,12 h后将DOX溶液和EXO_{DOX}(培养基溶解)分别以最终质量浓度 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 加入到共聚焦小皿中,给药2 h后,吸走上清液,用PBS洗2遍,后加4%多聚甲醛固定10 min, PBS洗2遍,加入DAPI染液($20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),染色30 min,共聚焦显微镜观察拍照,对比肝癌细胞对DOX的摄取差异。

2.8 统计学分析

所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并重复至少3次,使用GraphPad Prism 9.0软件进行数据处理分析和制图,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

3 结果

3.1 制备外泌体的表征

3.1.1 外泌体TEM观察 采用梯度离心法制备来源于肝癌细胞Hep1-6的外泌体,TEM观察结果如图1所示,所纯化的外泌体其粒径约为100 nm,呈现出形态均一的类圆形小囊泡,且具有良好的分散度。

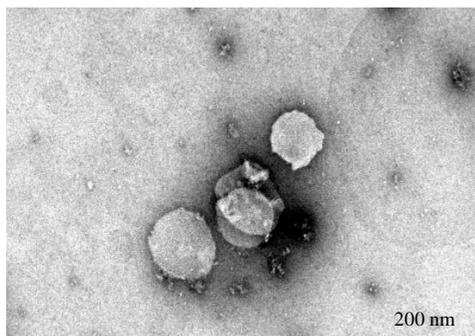


图1 外泌体形态透射电镜观察

Fig. 1 Exosome morphology observed by transmission electron microscope

3.1.2 外泌体特征蛋白Western blotting验证 外泌体属于细胞分泌一类特异性囊泡结构,往往起到不同细胞间通讯作用。经典外泌体标志物膜蛋白如CD63、CD81、TSG101常被用来鉴定外泌体。采用Western blotting法对制备得到的外泌体特征蛋白表达进行检测,结果见图2。制备的外泌体具有明显的标记蛋白CD63、CD81以及TSG101的表达,尤其是CD63和CD81蛋白表达水平显著高于细胞中表达水平,说明成功制备了肝癌细胞来源的外泌体。

3.1.3 外泌体的纳米颗粒追踪分析结果 细胞在

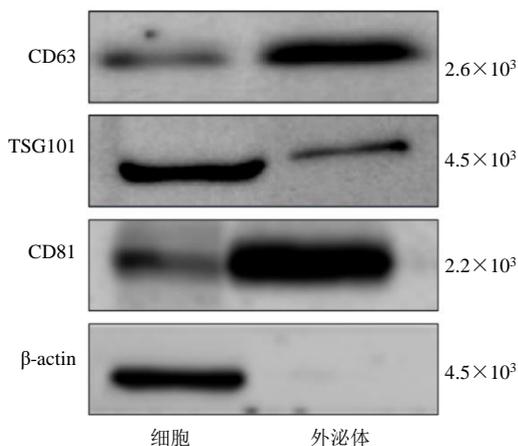


图2 外泌体标记蛋白的Western blotting检验

Fig. 2 Examination of exosome marker protein by Western blotting

生长过程中往往会产生不同的细胞外囊泡,既有粒径较小的外泌体,也会产生粒径较大的微囊泡以及凋亡小体。为了确定所制备外泌体的纯度以及相应的浓度水平,对所制备的外泌体进行NTA,图3结果显示制备的外泌体平均粒径为116.5 nm,测得平均浓度为 5.9×10^9 个 \cdot mL $^{-1}$,且分布相对比较均匀。以上结果说明外泌体被成功制备且表现出良好的形态与粒径分布。

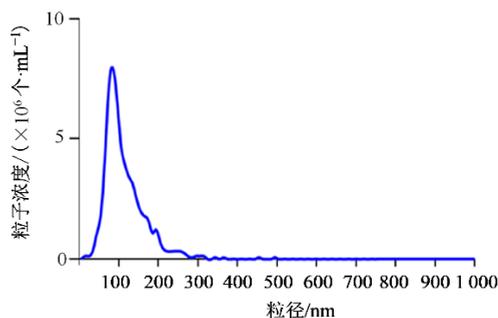


图3 外泌体NTA曲线

Fig. 3 NTA curve of exosomes

3.2 EXO_{DOX}的制备条件的确定

将制备得到的肝癌细胞外泌体与DOX混合后在电转仪下进行电穿孔,实现药物进入外泌体中,后在37℃下孵育外泌体,缓慢恢复后实现了对药物的有效包载。在电转过程中,不同条件下的结果见表1和图4。结果发现在电压过高时会出现明显的药物和外泌体共沉淀现象,推测可能是高电压对外泌体结构的破坏,这显著降低了外泌体的包载效率。设置条件为150 V和电容为75 μF时,无明显沉淀且包载效率最高,故此条件为制备EXO_{DOX}的最佳条件。

3.3 EXO_{DOX}对Hep1-6细胞增殖抑制作用

采用CCK-8法检测不同质量浓度下EXO_{DOX}和DOX对Hep1-6细胞增殖的影响,结果见图5。EXO_{DOX}和DOX对Hep1-6细胞增殖均具有明显的抑制作用,并呈现良好的质量浓度相关关系。质量浓度 ≥ 1 μg/mL $^{-1}$

表1 不同电转条件下外泌体与DOX包载情况($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Exosomes and DOX encapsulation under different electroporation conditions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

电转条件	外观变化	包载药物量 ^[22] /μg
350 V/100 μF	较多红色絮状沉淀	—
350 V/75 μF	红色絮状沉淀	—
200 V/100 μF	少量沉淀(絮状)	1.49±0.13
150 V/75 μF	无明显沉淀	2.76±0.21

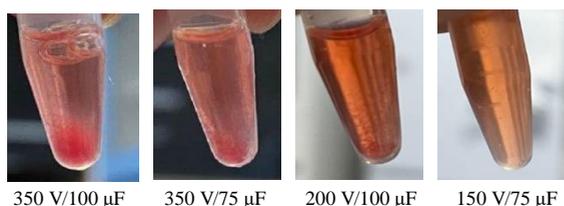


图4 不同电转条件下外泌体与DOX包载外观变化
Fig. 4 Changes in appearance of exosomes and DOX encapsulation under different electroporation conditions

时,EXO_{DOX}表现出比DOX更强的Hep1-6细胞增殖抑制活性($P < 0.05, 0.01$),EXO_{DOX}和DOX作用Hep1-6细胞24 h的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为(1.56±0.06)、(2.42±0.12)μg·mL⁻¹。结果表明外泌体对DOX的包载可有效提高其对肿瘤细胞的增殖抑制作用,推测其原因可能为细胞对同源性囊泡的摄取增加,药物更易在细胞中积聚,从而增强了活性。

3.4 EXO_{DOX}作用后Hep1-6细胞对DOX的摄取情况

利用激光共聚焦显微镜考察肿瘤细胞Hep1-6对EXO_{DOX}和DOX的摄取情况,给药2 h后免疫荧光染色结果及定量分析见图6。经EXO_{DOX}和DOX处理后

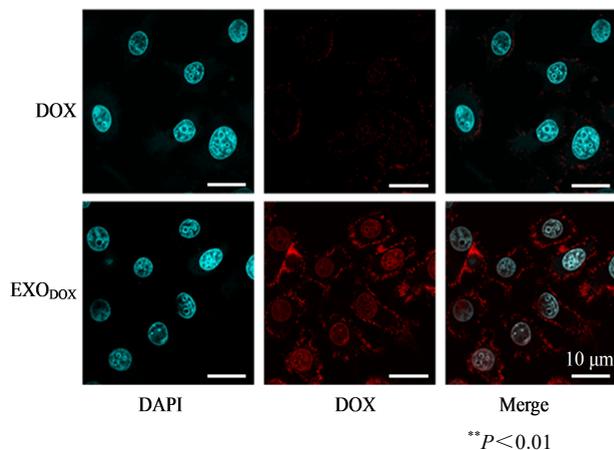
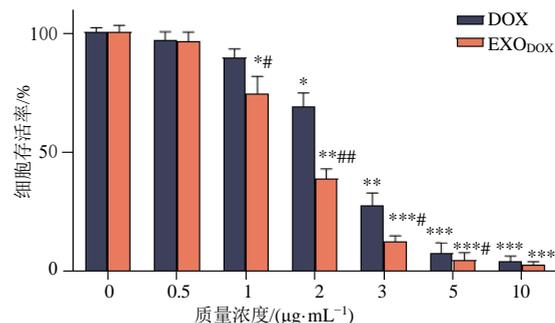


图6 Hep1-6细胞对EXO_{DOX}和DOX的摄取差异
Fig. 6 Difference in uptake of EXO_{DOX} and DOX by Hep1-6 cells

4 讨论

在临床上,化疗仍是肿瘤患者的首选治疗方案,包括顺铂、紫杉醇、5-氟尿嘧啶以及DOX在内的多种化疗药物是肝癌的一线治疗手段并取得了一定的疗效^[23]。但也存在一定缺陷,临床上DOX在治疗肝癌的同时伴随严重的不良反应,无法在延长生存期的同时保障患者的生存质量,其原因可能是DOX在治疗时不仅会对肿瘤细胞造成杀伤作用,也会对人体其他正常细胞具有细胞毒活性,同时一定程度上破坏人体免疫系统、抑制骨髓造血干细胞

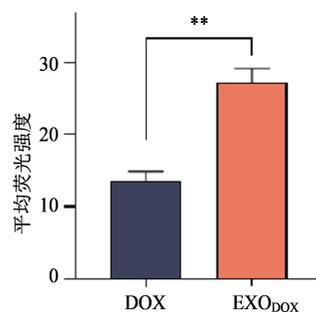


与对照组(0 μg·mL⁻¹)比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;与相同质量浓度DOX比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group (0 μg·mL⁻¹); # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs DOX at same concentration

图5 EXO_{DOX}和DOX对Hep1-6细胞增殖抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Inhibition of EXO_{DOX} and DOX on proliferation of Hep1-6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞中具有明显的DOX积聚(红色),且EXO_{DOX}组的DOX的荧光强度显著强于DOX组,说明EXO_{DOX}促进了DOX在肿瘤细胞的积聚,实现了有效的肿瘤靶向作用。



的功能,使肿瘤细胞产生耐药性^[24]。因此,提高药物在肿瘤细胞的积聚是目前克服此类问题的关键策略。

近年来,肿瘤靶向治疗策略不断革新,已实现对药物的修饰或者纳米给药系统的建立,凭借新技术已成功构建了可以高效靶向肿瘤细胞内特异性蛋白受体的药物,并显示出良好的治疗效果^[25]。而外泌体是极具潜力的新型生物载体,相比于人工合成的纳米材料,外泌体具有更好的生物相容性、更强的肿瘤靶向性以及更低的免疫原性,独具优势。

外泌体作为目前新兴且具备高效载药治疗潜力的生物纳米物质,其在靶向治疗疾病领域受到了广泛的关注,在药物载体领域具有巨大潜力,有可能成为靶向治疗肿瘤的重要策略。肿瘤细胞来源的外泌体因其同源性,可有效靶向肿瘤细胞进而实现更高的肿瘤积聚作用。因此,本研究考虑到肿瘤细胞来源外泌体“归巢”的优势特点,以小鼠肝癌细胞 Hep1-6 来源的外泌体为药物载体,实现了对 DOX 的有效包载。本研究首先通过对肝癌细胞外泌体进行理化性质表征,表明其具有良好且均一的形态,继而通过 Western blotting 及 NTA 分析对外泌体表征蛋白、粒径大小进行了验证。采用电穿孔的方法制备装载有化疗药物 DOX 的外泌体,并优化了相关实验参数。制备得到 EXO_{DOX} 后,进一步对比其与 DOX 在体外抗肿瘤活性以及肿瘤靶向性,发现外泌体对 DOX 的包载加强了 DOX 的抗肿瘤细胞增殖活性,这可能归因于肿瘤细胞对外泌体包载药物具有更高的摄取能力。

近年来外泌体的工程化改造被广泛应用于增强外泌体的细胞特异靶向性及其传递效率。较为常见的是应用基因工程方法,将编码靶向肽或者靶向蛋白的基因序列插入到信号肽和外泌体膜蛋白编码序列框,由此实现外泌体表面的功能化修饰,进一步增强其靶向性及药效作用。此外,亦有将外泌体和功能化的脂质体进行挤压融合,得到外泌体-脂质体纳米颗粒,显著增强了外泌体作为药物载体的靶向特性。以上提示可以继续对于本研究中构建的 EXO_{DOX} 药物递送体系进行改造升级,进一步增强其药效与靶向性,值得深入研究。

本研究以肿瘤细胞来源的外泌体为药物递送生物材料,实现了对化疗药 DOX 的有效装载,并验证了其高效的肿瘤杀伤和靶向能力,一定程度上证明了此类给药系统的有效性及其可行性,为该系统在靶向治疗中的应用提供了新思路,为临床一线化疗药 DOX 的新剂型开发提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siegel R, Miller K, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA A Cancer J Clin*, 2023, 73: 17-48.
- [2] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.
- [3] Xia C F, Dong X S, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: Profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584-590.
- [4] 赫捷, 陈万青, 沈洪兵, 等. 中国人群肝癌筛查指南 (2022, 北京) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(8): 1739-1758.
He J, Chen W Q, Shen H B, et al. China guideline for liver cancer screening (2022, Beijing) [J]. *J Clin Hepatol*, 2022, 38(8): 1739-1758.
- [5] Chen J G, Zhang S W. Liver cancer epidemic in China: Past, present and future [J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21(1): 59-69.
- [6] Anwanwan D, Singh S K, Singh S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1): 188314.
- [7] Llovet J M, Kelley R K, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 6.
- [8] Zhou F L, Teng F F, Deng P Z, et al. Recent progress of nano-drug delivery system for liver cancer treatment [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 17(14): 1884-1897.
- [9] Guo J F, Yu Z, Das M, et al. Nano codelivery of oxaliplatin and folinic acid achieves synergistic chemotherapeutic with 5-fluorouracil for colorectal cancer and liver metastasis [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 5075-5089.
- [10] Vaughan H J, Green J J, Tzeng S Y. Cancer-targeting nanoparticles for combinatorial nucleic acid delivery [J]. *Adv Mater*, 2020, 32(13): 1901081.
- [11] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles [J]. *Small*, 2008, 4(1): 26-49.
- [12] Maulvi F A, Desai D T, Shetty K H, et al. Advances and challenges in the nanoparticles-laden contact lenses for ocular drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2021, 608: 121090.
- [13] Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [14] Sun Z Q, Yang S X, Zhou Q B, et al. Emerging role of exosome-derived long non-coding RNAs in tumor microenvironment [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 82.
- [15] Wang H B, Lu Z M, Zhao X X. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 133.
- [16] Yang B W, Chen Y, Shi J L. Exosome biochemistry and advanced nanotechnology for next-generation theranostic platforms [J]. *Adv Mater*, 2019, 31(2): 1802896.
- [17] Shao J T, Zaro J, Shen Y X. Advances in exosome-based drug delivery and tumor targeting: From tissue

- distribution to intracellular fate [J]. *Int J Nanomed*, 2020, 15: 9355-9371.
- [18] Dai J, Su Y Z, Zhong S Y, et al. Exosomes: Key players in cancer and potential therapeutic strategy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 145.
- [19] Qiao L, Hu S Q, Huang K, et al. Tumor cell-derived exosomes home to their cells of origin and can be used as Trojan horses to deliver cancer drugs [J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3474-3487.
- [20] Liu Y C, Bai L M, Guo K L, et al. Focused ultrasound-augmented targeting delivery of nanosensitizers from homogenous exosomes for enhanced sonodynamic cancer therapy [J]. *Theranostics*, 2019, 9(18): 5261-5281.
- [21] Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy [J]. *J Cancer Res Ther*, 2014, 10(4): 853-858.
- [22] Zhou F, Li X, Xue X Y, et al. A novel tri-functional liposome re-educates "cold tumor" and abrogates tumor growth by synergizing autophagy inhibition and PD-L1 blockade [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023: e2202757.
- [23] Chandra A, Pius C, Nabeel M, et al. Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(16): 7018-7031.
- [24] Gonzalez-Fierro A, Dueñas-González A. Drug repurposing for cancer therapy, easier said than done [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 68: 123-131.
- [25] Hu J H, Cao J S, Topatana W, et al. Targeting mutant p53 for cancer therapy: Direct and indirect strategies [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 157.

[责任编辑 刘东博]