

壳寡糖-肉桂醛自组装纳米粒制备及其对乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

冯梦梦¹, 李从虎¹, 季栋栋², 宣兰兰², 王淑娴¹, 程旭^{1,2*}

1. 安庆师范大学 生命科学学院, 安徽 安庆 246133

2. 安庆市立医院博士后工作站, 安徽 安庆 246003

摘要: 目的 通过将肉桂醛 (CA) 共价接枝于壳寡糖 (COS) 侧链, 并进一步自组装形成纳米粒 (COS-CA-NPs), 探讨其在肿瘤微酸环境下对乳腺癌转移的抑制效应及潜在作用机制。方法 采用席夫碱反应合成不同接枝度的 COS-CA 衍生物, 分别命名为低接枝产物 (COS-CA_L) 和高接枝产物 (COS-CA_H); 通过水相诱导将两种衍生物自组装为纳米粒子 (COS-CA_L-NPs、COS-CA_H-NPs)。采用核磁共振氢谱 (¹H-NMR)、傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 表征 COS-CA 衍生物的化学结构; 通过粒径、多分散性指数 (PDI)、 ζ 电位评估纳米粒在不同 pH 环境下的理化特性, 并采用透射电镜观察两种纳米粒的外观形态; 采用 MTT 法检测纳米粒对 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞增殖的抑制效应; 通过细胞划痕和 Transwell 实验评价纳米粒对该细胞迁移、侵袭的影响; 利用免疫荧光法和蛋白质免疫印迹法, 检测纳米粒对核因子 (NF)- κ B 及基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 表达水平的调控效应。结果 成功合成 COS-CA_L、COS-CA_H 两种衍生物; 两种接枝比的 COS-CA-NPs 均呈球形, 粒径均小于 200 nm, 且在低 pH 时可逐渐解离并释放 CA。其中, 与 COS-CA_H-NPs 相比, COS-CA_L-NPs 对弱酸环境更为敏感, 在 pH 6.5 时可发生质子化并携带正电荷。中性环境下, 两种纳米粒对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制效果略低于游离 CA; 而在 pH 6.5 条件下, COS-CA_L-NPs 显著降低了 CA 对该细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。此外, 游离 CA、COS-CA_L-NPs、COS-CA_H-NPs 均能有效抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移与侵袭, 其中 COS-CA_L-NPs 的抑制效果最优 ($P < 0.01$)。其抑制乳腺癌转移的作用机制主要通过 CA 抑制 NF- κ B 活性、下调 MMP-9 表达水平实现。结论 COS-CA 接枝物可自组装形成纳米药物粒子, 其中 COS-CA_L-NPs 在肿瘤微酸环境中更易被乳腺癌细胞摄取并释放 CA, 进而通过调控 NF- κ B/MMP-9 信号通路, 有效抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭过程。

关键词: 壳寡糖; 肉桂醛; 肿瘤微酸环境; 乳腺癌; 迁移; 侵袭

中图分类号: R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2025)10-2879-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.10.015

Chitosan oligosaccharide-cinnamaldehyde self-assembled nanoparticles and its effects on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells

FENG Mengmeng¹, LI Conghu¹, JI Dongdong², XUAN Lanlan², WANG Shuxian¹, CHENG Xu^{1,2}

1. College of Life Sciences, Anqing Normal University, Anqing 246133, China

2. Anqing Municipal Hospital Postdoctoral Research Station, Anqing 246003, China

Abstract: Objective By covalently grafting cinnamaldehyde (CA) onto the side chains of chitosan oligosaccharides (COS) and further self-assembling to form nanoparticles (COS-CA-NPs), and investigating the inhibitory effect of these nanoparticles on breast cancer metastasis under the micro-acidic environment of tumors and their potential mechanism of action. **Methods** Different grafting degrees of COS-CA derivatives were synthesized via the Schiff base reaction and named as low grafting product (COS-CA_L) and high grafting product (COS-CA_H). The two derivatives were self-assembled into nanoparticles (COS-CA_L-NPs and COS-CA_H-NPs) through aqueous phase induction. The chemical structure of COS-CA derivatives was characterized by ¹H-NMR and FT-IR. The physicochemical properties of the nanoparticles at different pH environments were evaluated by particle size, polydispersity index

收稿日期: 2025-07-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32301126); 安徽省教育厅优秀青年基金资助项目 (2024AH030039); 安徽省中青年骨干教师培育项目 (YQYB2024037); 安徽省卫健委重点项目 (AHWJ2024Aa20195); 安徽省博士后科研项目 (2024C857)

作者简介: 冯梦梦, 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物纳米自组装。E-mail: 1187272324@qq.com

*通信作者: 程旭, 男, 博士, 副教授, 研究方向为生物医用材料与纳米医学。E-mail: chx9971@163.com

(PDI), and ζ potential. The morphology of the two nanoparticles was observed by transmission electron microscopy (TEM). The inhibitory effect of the nanoparticles on the proliferation of MDA-MB-231 human breast cancer cells was detected by MTT assay. The effects of the nanoparticles on cell migration and invasion were evaluated by cell scratch and Transwell assays. The regulatory effects of the nanoparticles on the expression levels of nuclear factor (NF)- κ B and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were detected by immunofluorescence and Western blotting. **Results** COS-CA_L and COS-CA_H derivatives were successfully synthesized. Both COS-CA-NPs with different grafting ratios were spherical, with particle sizes less than 200 nm, and could gradually dissociate and release CA at low pH. Compared with COS-CA_H-NPs, COS-CA_L-NPs were more sensitive to micro-acidic environments and could be protonated and carry positive charges at pH 6.5. Under neutral conditions, the proliferation inhibitory effects of the two nanoparticles on MDA-MB-231 cells were slightly lower than that of free CA. However, at pH 6.5, COS-CA_L-NPs significantly reduced the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of CA for this cell line. Additionally, free CA, COS-CA_L-NPs, and COS-CA_H-NPs could all effectively inhibit the migration and invasion of MDA-MB-231 cells, with COS-CA_L-NPs showing the best inhibitory effect ($P < 0.01$). The mechanism of inhibiting breast cancer metastasis mainly involves CA inhibiting NF- κ B activity and down-regulating MMP-9 expression levels. **Conclusion** COS-CA grafts can self-assemble into nanoparticles. Among them, COS-CA_L-NPs are more easily taken up by breast cancer cells and release CA in tumor micro-acidic environments, thereby effectively inhibiting the proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells through the regulation of the NF- κ B/MMP-9 signaling pathway.

Key words: chitosan oligosaccharides; cinnamaldehyde; tumor micro-acidic environment; breast cancer; migration; invasion

肉桂醛 (CA) 作为一种天然小分子化合物, 主要提取自肉桂皮精油。凭借卓越的生物活性与较低的不良反应发生率, CA 在食品科学、医药研发及化学工程等多个领域均获得了广泛应用^[1-2]。在抗肿瘤治疗领域, CA 展现出独特的多靶点、多通路协同作用机制, 可有效抑制肿瘤细胞的生长、增殖与转移过程, 其作用机制涵盖细胞周期调控、凋亡诱导、信号通路抑制及肿瘤微环境调节等关键环节^[3]。例如, CA 能够通过调控线粒体应激反应并升高细胞内活性氧 (ROS) 水平, 诱导非小细胞肺癌、肝癌、乳腺癌等多种癌细胞发生凋亡^[4]; 同时, CA 还可通过下调血管内皮生长因子 (VEGF) 或基质金属蛋白酶 (MMPs) 的表达水平, 进一步抑制肿瘤的生长与转移进程^[5]。因此, CA 作为一类具有多靶点作用特性的天然抗肿瘤活性物质, 在实体瘤及转移性肿瘤的治疗中展现出巨大的应用潜力。

然而, CA 分子因其强疏水性和高化学活性, 表现出难溶于水但易溶于有机溶剂的特性, 并且容易发生氧化或聚合反应, 尤其是在光照或高温条件下 CA 稳定性会显著下降^[6], 这极大限制了其在生物医药领域的广泛应用。为克服上述不足, 研究者常采用亲水性修饰策略对 CA 进行结构改造, 其中通过席夫碱反应 (即醛基与氨基形成亚胺键的可逆反应) 将 CA 与亲水性大分子 (如壳聚糖) 进行共价连接的方法被广泛应用。该修饰方式不仅能有效提升 CA 的水溶性, 还可借助亚胺键的酸敏感性实现药物在肿瘤微环境中的靶向释放, 从而最大限度

保留其药理活性^[7-8]。

壳寡糖 (COS) 是一类由 2~10 个氨基葡萄糖单元通过 β -1, 4 糖苷键连接形成的天然寡糖, 相较于高相对分子质量的壳聚糖, COS 具有更优异的水溶性、更高的生物安全性及更强的生物活性, 因此被广泛用作药物载体或功能助剂^[9]。基于此, 本研究通过席夫碱反应将不同物质的量的 CA 接枝到 COS 侧链上, 制备 CA 接枝比不同的 COS-CA 偶联物, 利用 COS-CA 的自组装特性, 使其形成纳米粒 (COS-CA-NPs)。系统探究不同 CA 接枝比对 COS-CA-NPs 理化性能 [如粒径分布、多分散性指数 (PDI)、 ζ 电位等] 的影响, 并深入分析 COS-CA-NPs 对人乳腺癌细胞增殖与迁移的调控作用, 旨在为拓展 CA 的实际应用场景、揭示其抗肿瘤迁移的分子机制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

NanoZS90 型纳米粒度电位分析仪 (DLS, 英国 Malvern 公司); 5700 型傅里叶变换红外光谱仪 (FT-IR, 美国 Nicolet 公司); JEM-2100 透射电镜 (TEM, 日本电子株式会社); FC 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); ZERO 型荧光显微镜 (上海雷特科技有限公司); Fourier 80 型核磁共振波谱仪 (NMR, 德国 Bruker 公司); T9 型全波段紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司)。

1.2 材料

COS (批号 P2115119, 山东优索化工科技有限

公司); CA (批号 A2119126, 上海艾迪生物化学技术有限公司); 噻唑蓝 (MTT, 批号 C16560339, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 牛血清白蛋白 BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 P0010, 碧云天生物技术有限公司); 核因子- κ B (NF- κ B, 批号 380831)、MMP-9 (批号 380831, 成都正能生物技术有限公司); 二抗 (批号 B900210, 武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.3 细胞

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购自浙江百迪生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 COS-CA-NPs 的制备及表征

称取 100 mg COS 溶于 20 mL 去离子水, 100 mg CA 溶于 5 mL 二甲亚砜 (DMSO)。在搅拌下, 分别将 1.45、2.90 mL 的 CA 溶液滴加至 COS 溶液中, 使 CA 的物质的量为 COS 侧链氨基物质的量的 0.7 倍和 1.4 倍, 以构建两种不同接枝比例的反应体系。反应过程中持续搅拌, 同时逐滴加入三乙胺 (TEA) 以维持体系弱碱性环境, 确保反应稳定进行, 总反应时长设定为 6 h。反应结束后, 利用去离子水透析去除有机溶剂, 冷冻干燥。为进一步去除未参与反应的游离 CA, 使用乙醚对冷冻干燥后的产物进行冲洗, 冲洗完毕后再次进行冷冻干燥, 最终得到两种不同接枝比例的目标产物, 分别命名为低接枝产物 (COS-CA_L) 和高接枝产物 (COS-CA_H)。为验证 CA 与 COS 的接枝效果及产物结构特征, 采用核磁共振氢谱 (¹H-NMR) 和 FT-IR 对产物的化学结构进行表征。

分别称取 20 mg COS-CA_L 和 COS-CA_H, 用无水乙醇超声助溶后, 缓慢滴加去离子水诱导自组装 (图 1)。将组装后的纳米溶液, 利用截留相对分子质量 500 的透析袋透析 24 h, 得到最终产物 COS-CA_L-NPs 和 COS-CA_H-NPs 粒子溶液, 冷冻干燥后得到黄色粉末样品。

2.1.1 接枝率的测定 通过茚三酮比色法测定反应前后 COS 侧链氨基的含量变化, 以间接反映 CA 的接枝效率^[10]。配制质量浓度为 1、5、10、20、40、80、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甘氨酸标准水溶液, 分别取 4 mL 加入比色管中, 再依次加入 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的茚三酮水溶液和 pH 8.0 的磷酸缓冲液各 1 mL, 混匀后水浴加热 15 min, 取出后冷却至室温, 加水至标线, 在 570 nm 测定吸光度, 拟合氨基标准曲线为 $Y=0.292$

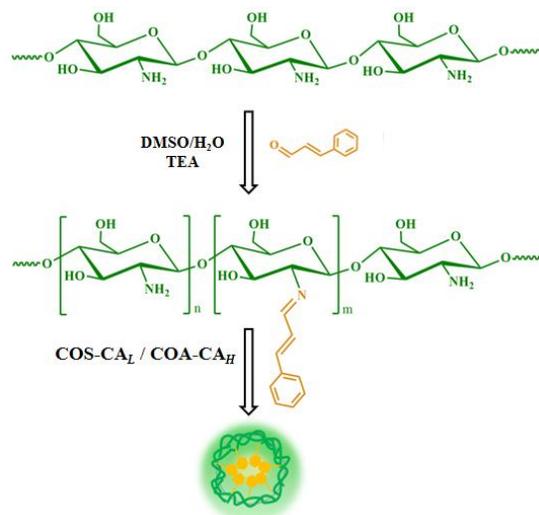


图 1 不同接枝比例 COS-CA 合成及组装路线
Fig. 1 Synthesis and assembly routes of COS-CA in different grafting ratios

$X=0.0169$, $r=0.9983$ 。将 COS 或 COS-CA 衍生物配制成质量浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 按上述方法测定氨基含量。通过比较反应前后的氨基含量, 可得 COS-CA_L 和 COS-CA_H 接枝率分别为 42.18%、96.56%。

2.1.2 CA 含量测定方法的建立 配制质量浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CA 乙醇母液, 稀释成 5、10、20、30、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 利用紫外分光光度计在 296 nm 处测定各质量浓度下 CA 的吸光度, 并拟合标准曲线 $Y=0.0412X-0.0063$, $r=0.9919$ 。称取 COS-CA_L-NPs、COS-CA_H-NPs 冻干粉各 10 mg, 用去离子水分散成 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液, 用 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸调节 pH 至 2.0, 避光搅拌反应 6 h 充分释放 CA。最后加入等体积二氯甲烷萃取, 收集有机相, 旋蒸后加入 1 mL 无水乙醇, 测定吸光度, 计算 COS-CA_L-NPs、COS-CA_H-NPs 样品中 CA 质量浓度分别为 142.31、312.26 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.1.3 ¹H-NMR 分析 氢谱参数: 温度 298.0 K; 谱宽 10 000 Hz; 脉冲宽度 11.5 μs ; 弛豫时间 2 s; 采样点数 32 786; 采样时间 3.0 s; 扫描次数 16。在 COS-CA_H 与 COS-CA_L 的氢谱中 (图 2), 均出现 $\delta=7.95$ 的特征单峰, 归属为席夫碱 (-CH=N-) 的特征质子峰, 证明 COS 与 CA 通过缩合反应成功形成亚胺键。同时, 在 δ 为 7.56~6.86 的多重峰与 CA 苯环质子的化学位移高度吻合, 进一步佐证 CA 结构单元已接入 COS 骨架。此外, δ 4.61~4.62 处的信号为糖环 H-1 质子, 其化学位移较天然 COS

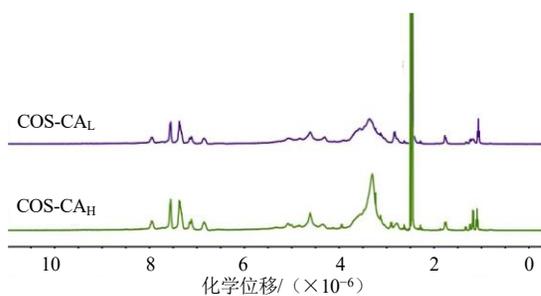


图 2 核磁氢谱图

Fig. 2 ¹H NMR spectra

($\delta < 4.5$)^[11]明显向低场移动,表明 CA 的引入对糖环电子环境产生扰动,间接证明接枝反应发生。

COS-CA_H ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.95 (1H, s), 7.56 (1H, d, $J=8.2$ Hz), 7.36 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 7.11 (1H, t, $J=7.6$ Hz), 6.86 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 4.61 (1H, s), 3.95~2.98 (m, 多糖骨架质子), 1.76 (3H, s), 1.09 (3H, s)。

COS-CA_L ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.95 (1H, s), 7.56 (1H, d, $J=8.2$ Hz), 7.36 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 7.11 (1H, t, $J=7.6$ Hz), 6.85 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 4.62 (1H, s), 3.91~3.04 (m, 多糖骨架质子), 1.76 (3H, s), 1.07 (3H, s)。

2.1.4 FT-IR 分析 图 3 为 COS 及其 CA 接枝物红外光谱。COS 在 3 000~3 500 cm^{-1} 附近的宽峰源于氨基的 N-H 伸缩振动及羟基的叠加吸收^[12]。与 COS 相比,不同比例 CA 接枝后该峰变窄,这是因为席夫碱反应中 CA 的醛基与 COS 侧链伯氨基发生亲核加成,形成 C=N 双键,导致 N-H 振动贡献减少。此外,两种 COS-CA 在 934 cm^{-1} 和 1 147 cm^{-1} 处出现特征吸收峰,分别归属于 CA 分

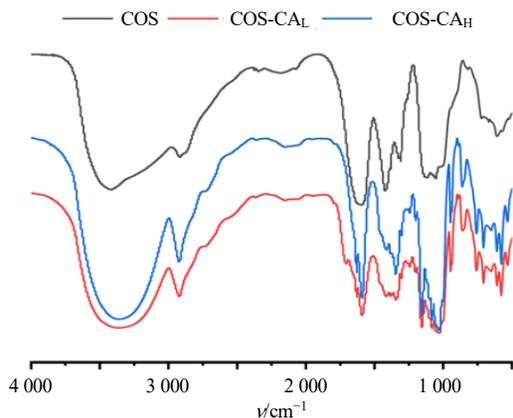


图 3 FT-IR 曲线

Fig. 3 FT-IR curve

子中醛基的 C-H 弯曲振动和取代苯环上 C-H 面外弯曲振动;同时,在 1 627 cm^{-1} 处出现明显的亚胺 (C=N) 伸缩振动,这些结果证实 CA 通过席夫碱反应接枝到 COS 侧链。

2.1.5 TEM 观察 将 2 种纳米粒子溶液稀释 3 倍后滴加到碳膜铜网的覆膜面上,静置 5 min,用滤纸吸去多余液体,2%磷钨酸染色后,烘干铜网,最后利用 TEM 观察形貌。由图 4 可知,两种纳米颗粒均呈现近似球形的形态,且其实际尺寸小于动态光散射 (DLS) 测试的结果,这一差异可能是由于 TEM 样品制备过程中需要干燥处理,水化层被破坏导致。

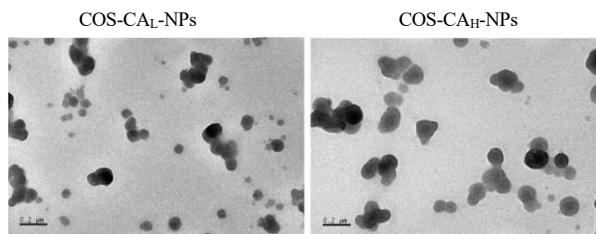


图 4 TEM 图 ($\times 100\ 000$)

Fig. 4 TEM images ($\times 100\ 000$)

2.1.6 粒径、PDI 和 ζ 电位 将两种纳米粒子在 pH 7.4 条件下稀释数倍后转移至比色皿中,再利用 DLS 测定该条件下的粒径、 ζ 电位和 PDI。表 1 显示了两种 COS-CA 衍生物组装后的纳米粒子的性能。在 pH 7.4 条件下 COS-CA_H-NPs 粒径约为 170 nm,而 COS-CA_L-NPs 粒径略大。这可能是因为 CA 接枝比越高,粒子内部 CA 分子的疏水相互作用和 π - π 堆积效应越强,从而导致形成的纳米颗粒尺寸更小^[13]。此外,两种纳米颗粒的 PDI 无显著差异,表明两亲性组装能提升 CA 的分散性能。 ζ 电位分析显示,两种纳米颗粒表面均带有轻微的负电荷,这是由于 COS 侧链上的氨基在中性环境下的酸解离常数 (pK_a) 值为 6.5^[14],因此未表现出明显的电荷特性。

由于 CA 通过酸敏感的席夫碱接枝在 COS 侧链上,本研究进一步评估了低 pH 对纳米颗粒的影响。由表 1 可知,随着 pH 值逐渐降低,两种纳米颗粒的粒径和 PDI 均显著增加,尤其在 $\text{pH} \leq 6.0$ 时,这种变化更为明显。这个结果证明酸性介质能够水解席夫碱化学键,破坏粒子的亲疏水平衡,从而导致粒子逐渐分散并增大,同时伴随着较差的分散性;同时也说明席夫碱对弱酸敏感程度较弱,在 $\text{pH} \leq 6.0$ 时才开始发生明显的水解反应^[15]。此外,随着 pH 值的降低,粒子的 ζ 电位逐渐从负值转变为正值,这

表 1 COS-CA-NPs 在不同 pH 值下的粒径、PDI 及 ζ 电位 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Particle size, PDI and ζ potential of COS-CA-NPs at different pH values ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	pH	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	样品	pH	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
COS-CA _H -NPs	7.4	171.32±3.18	0.23±0.04	-1.52±0.17	COS-CA _L -NPs	7.4	193.17±4.04	0.18±0.11	-2.71±0.34
	6.8	178.14±2.66	0.21±0.08	-1.16±0.35		6.8	233.17±1.98	0.22±0.08	-0.85±0.28
	6.5	191.15±3.73	0.24±0.11	-1.22±0.38		6.5	289.34±3.36	0.28±0.06	1.46±0.62
	6.0	267.78±1.46	0.27±0.07	0.77±0.29		6.0	345.77±2.36	0.26±0.14	2.76±0.48
	5.5	323.17±2.34	0.36±0.12	2.51±1.01		5.5	464.13±6.71	0.31±0.05	3.71±0.39
	5.0	478.23±5.17	0.33±0.09	3.78±0.68		5.0	557.81±7.18	0.34±0.13	5.67±0.57

是由于 COS 中的氨基在低 pH 条件下发生质子化并带正电荷所致^[16]。值得注意的是，两种纳米颗粒的电荷变化存在一定的差异。COS-CA_H-NPs 在 pH 6.0 时开始表现出相转变行为，这是由于席夫碱水解释放氨基所导致；而 COS-CA_L-NPs 在 pH 6.5 时即转变为正电荷，这归因于其较低的接枝率，促使残留的氨基更容易发生质子化。

2.2 体外释药行为研究

取 COS-CA_L-NPs 和 COS-CA_H-NPs 溶液(CA 质量浓度均为 240 μg·mL⁻¹)各 1 mL 加入到透析袋(截留相对分子质量 3.5×10³)中，浸没到 10 mL 不同 pH 缓冲液中，置于摇床，参数设置为 100 r·min⁻¹、37 °C。分别在 0.5、1.0、2.0、6.0、12.0、24.0、

48.0、72.0 h 取样 2.0 mL，回收释放介质并加入等量新鲜介质。根据“2.1.2”项下标准曲线测算 CA 释放量，进而分析不同接枝比例纳米粒子的药物释放规律。结果如图 5 所示。在 pH 7.4 时，两种纳米粒中 CA 累积释放率均低于 5%，说明它们在生理环境中能维持较好的稳定性；在 pH 6.5 时，尽管 CA 的释放率随时间延长而增加，但 72 h 内释放量仍低于 30%；当 pH 降低至 5.0 时，CA 释放明显增加，72 h 累积释放接近 60%。这个结果说明席夫碱对肿瘤胞外 pH 响应性较差^[8,17]，对肿瘤细胞内 pH 敏感性较高，有助于药物的胞内释放。此外，两种纳米粒子的释放曲线相似，提示接枝比差异对药物释放影响较小。

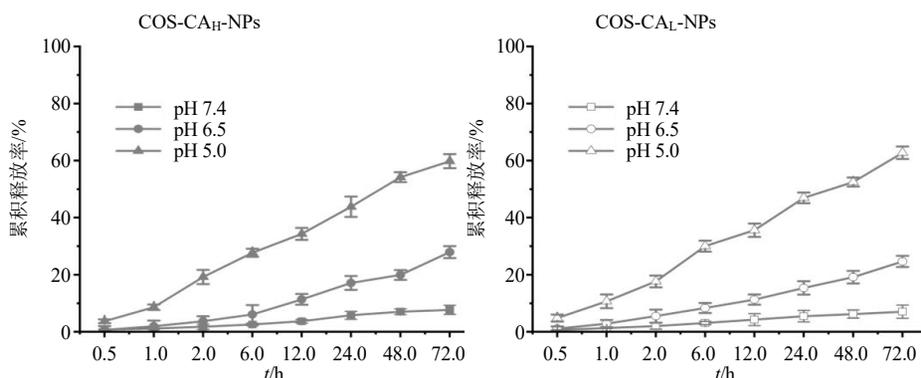


图 5 COS-CA_H-NPs 与 COS-CA_L-NPs 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

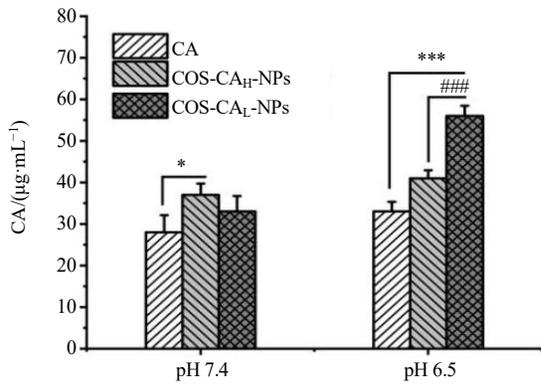
Fig. 5 *In vitro* release curve of COS-CA_H-NPs and COS-CA_L-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3 细胞内 CA 含量考察

取 100 mg CA 置于 1 mL DMSO 中，震荡溶解，配成 100 mg·mL⁻¹ 的 CA 母液，放入 -20 °C 冰箱中备用；取“2.1”项下 COS-CA_L-NPs、COS-CA_H-NPs 冻干粉各 100 mg，用纯化水配制成质量浓度均为 100 mg·mL⁻¹ 的溶液。加药时将 CA 母液与溶液分别溶于 DMEM 培养基稀释至 80 μg·mL⁻¹^[8]。之后，将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 1×10⁴ 个·mL⁻¹

的密度接种在细胞培养皿中，贴壁后分别与游离 CA、COS-CA_L-NPs 和 COS-CA_H-NPs 共培养 4 h，培养基 pH 分别调节至 7.4 和 6.5。培养结束后，清洗细胞，裂解离心后，收集上清，按“2.1.2”项下方法，测定 CA 含量。

图 6 显示了 3 种 CA 制剂在不同 pH 环境下的细胞内药物含量。与 CA 相比，两种纳米制剂均能提高胞内 CA 含量，这归因于游离 CA 的疏水性强



与 CA 比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与 COS-CA_L-NPs 比较: ### $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs CA; ### $P < 0.001$ vs COS-CA_L-NPs.

图 6 不同 pH 环境下细胞内 CA 含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Intracellular CA levels of different pH environments ($\bar{x} \pm s, n=3$)

使其难以均匀分散于培养基中, 而 COS 的引入改善了其分散性, 从而促进细胞摄取效率。此外, 在 pH 7.4 时, COS-CA_H-NPs 和 COS-CA_L-NPs 的细胞内药物含量无明显差异; 但在 pH 6.5 时, COS-CA_L-NPs 的药物水平显著高于 COS-CA_H-NPs ($P < 0.001$)。这一现象是因为 COS-CA_L-NPs 接枝率较低, 残留的伯氨基在 pH 6.5 时质子化带正电荷, 通过静电相互作用与负电性的细胞膜结合, 增强了细胞摄取能力。考虑到肿瘤组织通常处于弱酸性环境 (pH 6.5~7.2), 这种电荷翻转特性将有助于提高纳米药物在肿瘤部位的利用率。

2.4 MTT 法检测细胞毒性

将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞用胰酶消化后, 以 1×10^3 个·mL⁻¹ 的密度接种于 96 孔板中, 每

孔 200 µL。在 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 24 h 后, 移除旧培养基, 分别加入 180 µL 不同 pH 值的 (7.4 与 6.5) 新鲜培养基和 20 µL 质量浓度分别为 3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000 µg·mL⁻¹ 的 CA、COS-CA_L-NPs 和 COS-CA_H-NPs, 每个浓度设置 6 个复孔, 并设置对照组 (仅含有细胞及培养基) 和空白组 (无细胞)。共培养 4 h 后, 再次移除培养基, 加入 200 µL 培养基继续培养 24 h。培养结束后, 每孔加入 20 µL MTT 溶液 (终质量浓度为 5.0 mg·mL⁻¹)。避光孵育 4 h 后, 弃去上清液, 加入 150 µL DMSO 染色, 振荡 10 min 后, 使用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率^[8,11]。

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

图 7 为不同 pH 条件下 CA 制剂对 MDA-MB-231 细胞的毒性效应。在 pH 7.4 时, CA、COS-CA_H-NPs 和 COS-CA_L-NPs 呈现剂量相关的杀伤效应, 最终的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 35.98、49.84、52.53 µg·mL⁻¹。由此可知, 游离 CA 作用效果优于两种纳米药物粒子, 这可能是由于 CA 从粒子中释放导致的时间滞后性所致。此外, 在 pH 6.5 时, CA 和 COS-CA_H-NPs 作用效果与 pH 7.4 无较大区别, IC₅₀ 分别为 32.13、47.02 µg·mL⁻¹; 而 COS-CA_L-NPs 杀伤细胞能力则显著增强, IC₅₀ 降至 24.92 µg·mL⁻¹。这个结果提示酸性环境增强 COS-CA_L-NPs 胞内药物富集, 可以弥补药物释放导致的时间滞后性, 从而导致更高的细胞杀伤效应。

2.5 划痕实验检测细胞迁移

将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板, 每孔 1×10^5 个细胞, 用 200 µL 无菌枪头划痕, 并

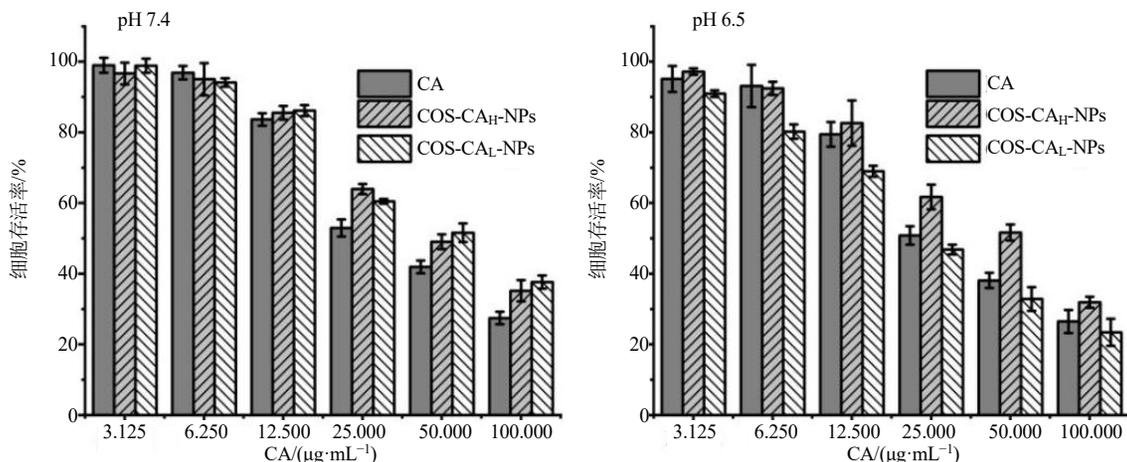


图 7 CA、COS-CA_H-NPs、COS-CA_L-NPs 的体外细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 In vitro cell survival rate of CA, COS-CA_H-NPs, COS-CA_L-NPs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

以 PBS 清洗去除脱落细胞,显微镜下拍照并用 Image-J 测量记录初始(0h)划痕宽度 S_0 。随后用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 无菌 HCl 调节培养基 pH 至 7.4 或 6.5, 加入 CA、COS-CA_H-NPs、COS-CA_L-NPs (质量浓度均为 IC_{50}), 对照组不加药, 细胞密度同“2.4”项, 每组 3 个复孔, 孵育 4 h 后, 更换新鲜培养基。再继续培养 24、36 h 时拍照, 观察划痕愈合情况并统计划痕宽度 S_t , 计算划痕愈合率, 划痕越宽表明细胞迁移能力越弱。

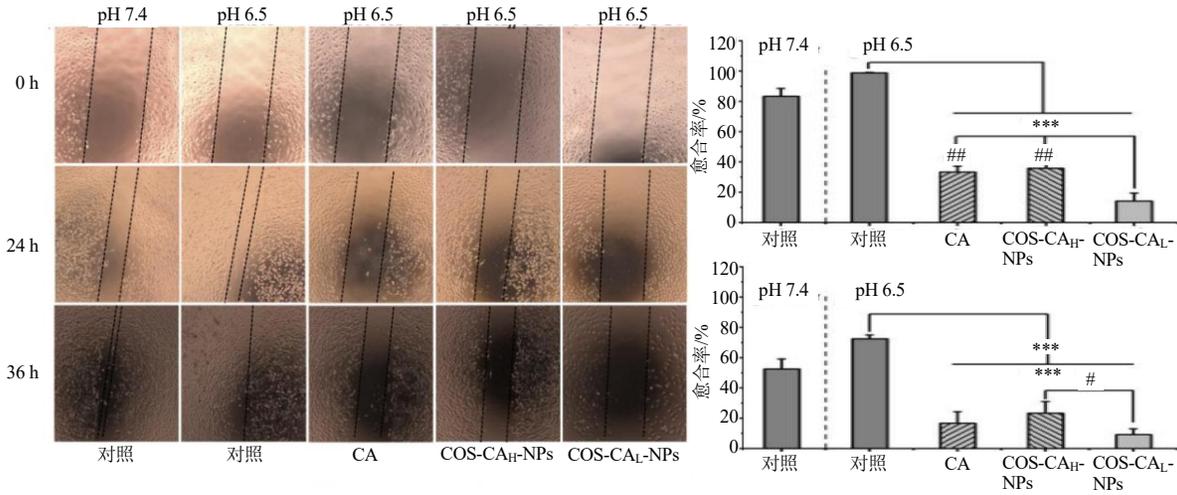
$$\text{愈合率} = (S_0 - S_t) / S_0$$

结果见图 8, 在 pH 6.5 条件下, 对照组的细胞划痕愈合速率略高于 pH 7.4 环境, 表明弱酸环境在一定程度上可促进肿瘤细胞的迁移。在 pH 6.5 环境下, 与对照组相比, 各给药组在 24、36 h 均能显著抑制细胞迁移 ($P < 0.001$); 其中, COS-CA_L-NPs

组的抑制效果更为突出, 其抑制作用均显著强于其他给药组 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

2.6 Transwell 实验检测细胞侵袭

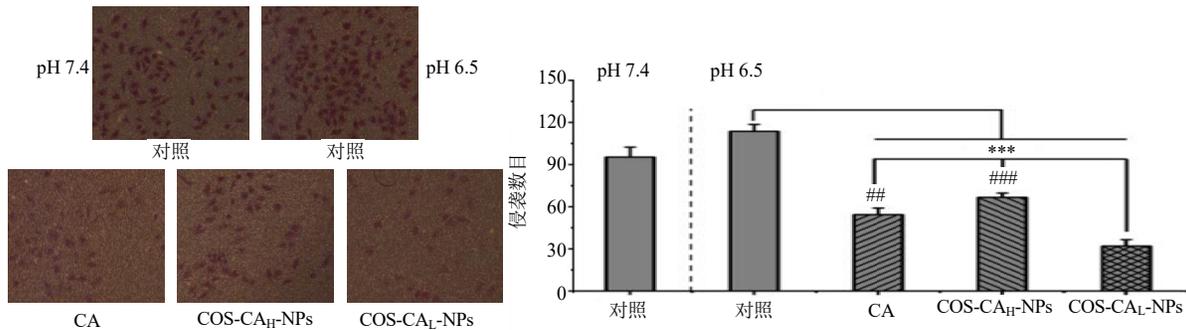
参照文献方法^[19], 将预冷 Matrigel 基质胶按 1 : 8 与无血清 DMEM 培养基混合, 取 $100 \mu\text{L}$ 均匀铺布于 Transwell 上室底部, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 0.5 h, 待基质胶完全凝固。实验分组及给药同“2.5”项, 培养 4 h 后, 收集并重悬细胞。取 $200 \mu\text{L}$ 细胞悬液 ($1 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$) 接种于上室, 下室加入 $600 \mu\text{L}$ 含 10% 胎牛血清的培养基, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h。培养结束后, 取出小室弃去培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 经 4% 多聚甲醛固定和 0.1% 结晶紫染色, 棉签擦除未侵袭细胞, 于倒置显微镜下随机选取 5 个视野计数。结果见图 9。



与 pH 6.5 的对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 COS-CA_L-NPs 比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
*** $P < 0.001$ vs control group at pH 6.5; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs COS-CA_L-NPs.

图 8 细胞划痕成像 (A) 及 24 h (B) 和 36 h (C) 划痕愈合率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Cell scratch imaging (A) and scratch healing rates at 24 h (B) and 36 h (C) ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与 pH 6.5 的对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 COS-CA_L-NPs 比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。
*** $P < 0.001$ vs control group at pH 6.5; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs COS-CA_L-NPs.

图 9 细胞侵袭成像 (A) 及侵袭数目 (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Cell invasion imaging (A) and invasion count (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

在 pH 6.5 条件下, 与对照组相比, 各给药组均能极显著降低侵袭细胞数 ($P < 0.001$)。值得注意的是, 与其他给药组相比, COS-CA_L-NPs 组侵袭细胞数降低幅度更为显著 ($P < 0.01$ 、 0.001)。表明低接枝比纳米粒子凭借其丰富的氨基残留显著增强酸性微环境下的细胞摄取效率, 进而通过协同作用增强肿瘤细胞侵袭抑制效应。

2.7 免疫荧光染色检测 NF-κB 蛋白的核易位

参照文献方法^[18], 将 MDA-MB-231 细胞以每孔 1×10^4 个接种至细胞培养皿上, 待融合度达到 80% 时分组, 组别设置同“2.5”项。药物干预 4 h 后更换新鲜培养基继续培养 24 h, 经 PBS 清洗、4% 多聚甲醛固定 20 min、0.1% Triton X-100 通透 15 min、5% BSA 封闭 1 h, 随后加入抗 p65 一抗 (1:200) 4 °C 孵育过夜。经 PBS 清洗后与 Alexa Fluor 488 标记二抗 (1:500) 室温避光孵育 1 h, DAPI 复染细胞核 10 min, 最后利用荧光显微镜观察采集图像。结果如图 10 所示, pH 6.5 对照组核内 p65 荧光强度较 pH 7.4 组略微增强, 表明酸性微环境对 NF-κB 核易位有促进作用但无统计学意义。此外, 与对照组相比, 各给药组在 pH 6.5 条件下均显著抑制 NF-κB 核转移: CA 组与 COS-CA_H-NPs 组抑制效果显著 ($P < 0.05$), 而 COS-CA_L-NPs 组抑制效果极显著 ($P < 0.01$), 其核荧光强度最低。上述结果证实低接枝比纳米粒子可更有效地阻断 NF-κB 通路活化, 这与抗侵袭结果一致。

2.8 Western blotting 实验检测 MMP-9 蛋白表达

将细胞接种在 6 孔板中, 按“2.5”项分组给药

处理 4 h 后, 利用适量 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂混合液室温孵育 30 min。之后, 将每孔细胞转移至离心管中离心, 收集上清, 并用 BCA 法测其浓度。根据文献方法^[19], 将蛋白样品与 Loading buffer 按 4:1 比例混合, 100 °C 变性 10 min 后上样至 SDS-PAGE 凝胶, 电泳分离后转膜至 PVDF 膜。经 TBST 清洗后使用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入 MMP-9 一抗 (1:1000) 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗后与 HRP 标记二抗室温孵育 2 h, 最后通过化学发光法显影并采用 Image J 进行灰度值分析。结果如图 11 所示, 与 pH 7.4 对照组相比, pH 6.5 对照组 MMP-9 表达无显著变化。与对照组相比, 各给药组在 pH 6.5 条件下均显著抑制 MMP-9 表达: CA 组与 COS-CA_H-NPs 组分别下调 22% 和 31% ($P < 0.05$), 而 COS-CA_L-NPs 组抑制效果最为显著, 下调达 58% ($P < 0.001$)。研究表明, NF-κB 作为关键转录因子, 可通过结合 MMP-9 启动子区域调控其表达^[3], 本研究中 NF-κB 核易位抑制与 MMP-9 下调趋势一致, 提示 COS-CA 纳米粒子可能通过抑制 NF-κB/MMP-9 通路发挥抗侵袭作用。该机制与 CA 在肺癌^[20]和黑素瘤^[21]中的研究结果相吻合, 但在乳腺癌中具体调控网络仍需进一步验证。值得注意的是, COS-CA_L-NPs 在酸性环境下展现出的最强抑制效应, 这与其高氨基含量促进细胞摄取的特性密切相关。

2.9 统计分析

采用 Prism8.0 软件进行统计, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 Student-*t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

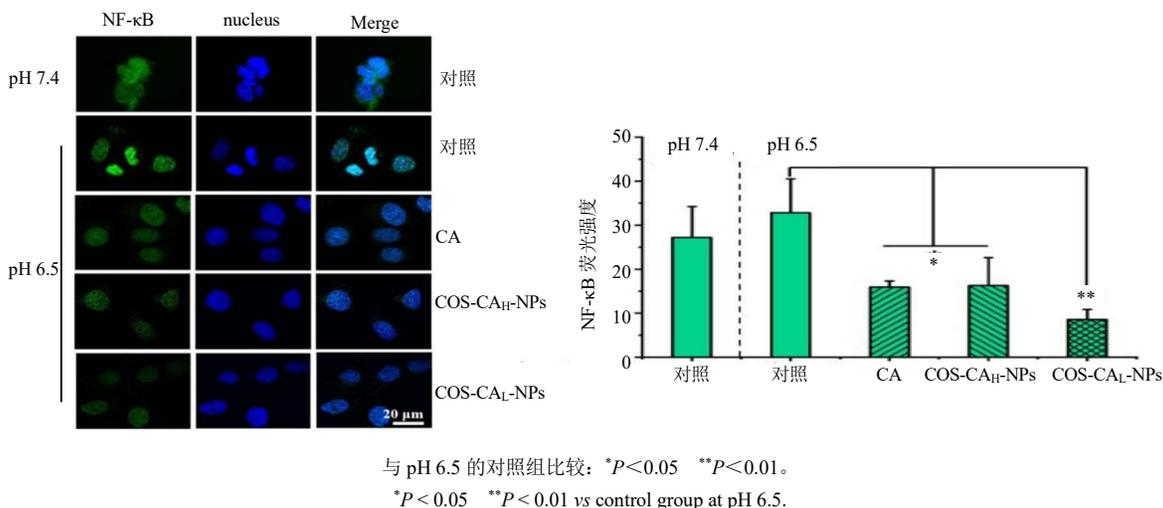


图 10 3 种 CA 制剂对 NF-κB 表达的荧光成像 (A) 及荧光强度统计 (B) ($\times 400 \bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Images of three CA formulations on the expression of NF-κB (A) and fluorescence intensity (B) ($\times 400 \bar{x} \pm s, n=3$)

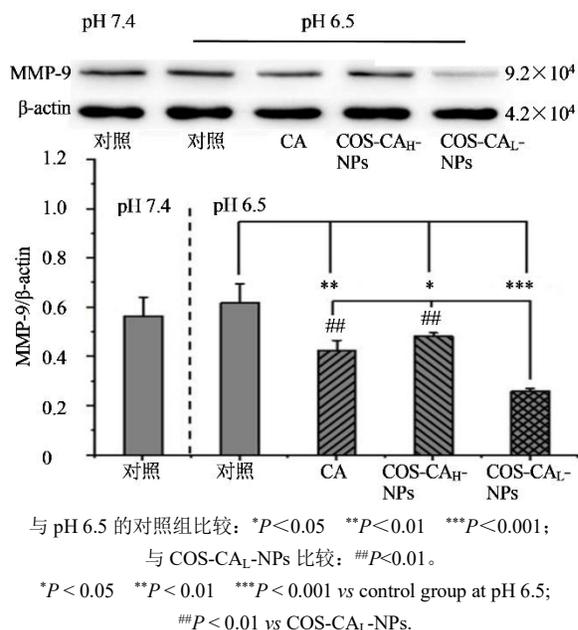


图 11 3 种 CA 制剂对 MMP-9 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
 Fig. 11 Effects of three CA formulations on the expression of MMP-9 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

CA 作为一种具有多靶点抗肿瘤活性的天然化合物，在抑制肿瘤生长和转移方面展现出广阔应用前景^[1-2]。然而，其固有的强疏水性、化学不稳定性及潜在的全身毒性，构成了临床转化的关键瓶颈^[6]。本研究将 CA 通过酸敏感的席夫碱键共价接枝于水溶性优异的 COS 侧链，并利用其两性性诱导自组装形成 COS-CA-NPs，最终构建一种能响应肿瘤微酸环境的智能递送系统，旨在克服 CA 的缺陷并增强其抗乳腺癌转移效应。

相比于传统的物理包封策略（如脂质体、胶束等^[22-23]），本研究采用的共价接枝策略具备双重核心优势：一方面通过共价键合实现 CA 与 COS 的稳定结合，有效避免了传统物理包封中药物提前渗漏的弊端；另一方面借助席夫碱键的酸敏感性，系统可在肿瘤胞内酸性 pH 环境下触发 CA 靶向释放，实验显示 72 h 药物累积释放率可达 60%。进一步地，通过调控 CA 与 COS 的接枝比，还能实现纳米粒表面电荷的精准相转变，且不同接枝比对应显著差异的 pH 响应阈值：COS-CA_L-NPs 在 pH 6.5 时即可完成从轻微负电到显著正电的转变，而 COS-CA_H-NPs 需在更低 pH (≤ 6.0) 条件下才发生类似变化。这一差异的本质原因在于，COS-CA_L-NPs 保留了更多未被 CA 占据的游离氨基，而 COS 氨基的解离常数 ($pK_a \approx 6.5$ ^[14]) 决定了其在接近该 pH 值

时即可发生质子化，进而触发电荷翻转；高接枝比的 COS-CA_H-NPs 因游离氨基占比低，需更强酸性环境才能实现质子化与电荷转变。

细胞实验结果进一步验证了 COS-CA-NPs 的 pH 响应特性，且不同 pH 条件下系统性能呈现明确差异：在模拟正常生理环境的 pH 7.4 条件下，两种纳米粒的细胞摄取效率虽均优于游离 CA，但细胞毒性及对肿瘤细胞迁移、侵袭的抑制效果却略低于游离 CA，这一现象源于纳米粒内药物需经键断裂释放后才能发挥作用，存在一定释放滞后性^[24-25]，而游离 CA 可直接作用于细胞，短期内活性更优。但在肿瘤微环境 pH 6.5 时，COS-CA_L-NPs 展现出显著的环境响应特异性：其快速发生的电荷翻转（从负电转为正电）显著增强了与带负电肿瘤细胞膜的静电相互作用，促使胞内 CA 浓度显著高于 COS-CA_H-NPs 及游离 CA；这种高效细胞摄取效应有效补偿了药物释放的滞后性，最终使 COS-CA_L-NPs 表现出更优性能，细胞毒性 IC₅₀ 值将至 24.92 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，对肿瘤细胞迁移、侵袭的抑制效果具有统计学显著性 ($P < 0.01$)。由此可见，通过接枝比调控实现的“pH 6.5 触发电荷翻转”特性，是 COS-CA_L-NPs 具备肿瘤微环境靶向潜力的关键机制。

机制层面，本研究证实 CA 纳米粒可通过双重作用抑制乳腺癌转移：一方面有效抑制 NF- κ B 的核转位，另一方面显著下调 MMP-9 的表达。作为关键的促炎与促转移转录因子，NF- κ B 的激活会上调包括 MMP-9 在内的多种基质金属蛋白酶表达，进而加速细胞外基质降解、促进肿瘤细胞侵袭^[26-27]，而本研究观察到的 NF- κ B 抑制与 MMP-9 下调协同效应，明确提示调控 NF- κ B/MMP-9 信号通路是 CA 抑制乳腺癌细胞迁移与侵袭的核心分子基础。这一发现与 CA 在肺癌、皮肤癌等其他肿瘤模型中的作用路径存在一致性^[20-21]，进一步揭示了 CA 通过靶向 NF- κ B/MMP-9 轴抑制肿瘤转移的普适性潜力。值得注意的是，当前研究尚未明确 CA 是否直接调控 NF- κ B 与 MMP-9 启动子的结合，后续需通过免疫共沉淀等实验进一步验证二者的直接关联。此外，尽管 COS-CA-NPs 在体外模拟环境中展现出显著优势，但其体内稳定性、生物相容性及体内抗转移效果仍需验证，因此后续研究可聚焦于开展动物实验，系统评估 COS-CA-NPs 的体内药动学特征、组织分布规律及在体抗肿瘤效果，并基于实验结果优化纳米粒结构（如接枝比、表面修饰），为其临

床转化提供更坚实的实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献:

- [1] Weng X L, Ho C T, Lu M W. Biological fate, functional properties, and design strategies for oral delivery systems for cinnamaldehyde [J]. *Food Funct*, 2024, 15(12): 6217-6231.
- [2] Han R X, Li X Y, Gao X F, et al. Cinnamaldehyde: Pharmacokinetics, anticancer properties and therapeutic potential (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2024, 30(3): 163.
- [3] Peng J H, Song X, Yu W B, et al. The role and mechanism of cinnamaldehyde in cancer [J]. *J Food Drug Anal*, 2024, 32(2): 140-154.
- [4] Nile A, Shin J, Shin J, et al. Cinnamaldehyde-rich cinnamon extract induces cell death in colon cancer cell lines HCT 116 and HT-29 [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8191.
- [5] 冯雨萌, 袁诗俊, 张娜, 等. 肿瘤细胞外基质在肿瘤中的作用及治疗策略 [J]. *生命的化学*, 2024, 44(10): 1806-1812.
- Feng Y M, Yuan S J, Zhang N, et al. The role and therapeutic strategies of tumor extracellular matrix in tumors [J]. *Chem Life*, 2024, 44(10): 1806-1812.
- [6] Yu C, Li Y L, Liang M, et al. Characteristics and hazards of the cinnamaldehyde oxidation process [J]. *RSC Adv*, 2020, 10(32): 19124-19133.
- [7] Zhang G Y, Li T L, Liu J, et al. Cinnamaldehyde-contained polymers and their biomedical applications [J]. *Polymers (Basel)*, 2023, 15(6): 1517.
- [8] Chen Q, Jia C C, Xu Y R, et al. Dual-pH responsive chitosan nanoparticles for improving in vivo drugs delivery and chemoresistance in breast cancer [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 290: 119518.
- [9] Leal M R S, Lima L R A, Rodrigues N E R, et al. A review on the biological activities and the nutraceutical potential of chitooligosaccharides [J]. *Carbohydr Res*, 2025, 548: 109336.
- [10] 徐先洲, 祝苑, 胡瑞, 等. 鸡粪发酵液中总游离氨基酸的粗提取及茚三酮法检测 [J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(11): 195-198.
- Xu X Z, Zhu Y, Hu R, et al. Crude extraction of total free amino acids from chicken manure fermentation broth and determination by ninhydrin method [J]. *Chin J Anim Sci*, 2021, 57(11): 195-198.
- [11] 毕晨, 游清徽. 雷公藤红素-氨基葡萄糖酰胺偶联物的合成及其减毒调脂作用 [J]. *中草药*, 2024, 55(4): 1158-1166.
- Bi C, You Q H. Synthesis of celastrol-glucosamine conjugate and its lipid-lowering effects [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(4): 1158-1166.
- [12] Thu Thao N T, Wijerathna H M, Saravana Kumar R, et al. Preparation and characterization of succinyl chitosan and succinyl chitosan nanoparticle film: *in vitro* and *in vivo* evaluation of wound healing activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 193(Pt B): 1823-1834.
- [13] Dias C, Commin L, Bonnefont-Rebeix C, et al. Comparative evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of a series of chitosans and chitooligosaccharides water-soluble at physiological pH [J]. *Polymers (Basel)*, 2023, 15(18): 3679.
- [14] Li J X, Tang R M, Zhang P H, et al. The preparation and characterization of chitooligosaccharide-poly lactide polymers, and *in vitro* release of microspheres loaded with vancomycin [J]. *J Funct Biomater*, 2022, 13(3): 113.
- [15] Li W T, Li W W, Zhai X X, et al. pH/Hyal-responsive vancomycin-loaded chitooligosaccharide nanoparticles for intracellular MRSA infection treatment [J]. *Mater Today Bio*, 2025, 32: 101731.
- [16] Sharma S, Shukla P, Misra A, et al. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development* [M]. Amsterdam: Elsevier, 2014: 149-172.
- [17] Kong M L, Peng X W, Cui H, et al. pH-responsive polymeric nanoparticles with tunable sizes for targeted drug delivery [J]. *RSC Adv*, 2020, 10(9): 4860-4868.
- [18] 周宏, 陈硕, 李博野, 等. 山豆根激活小胶质细胞炎症诱导神经毒性的机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(1): 100-109.
- Zhou H, Chen S, Li B Y, et al. Mechanism of activation of microglia inflammation induced neurotoxicity by *Sophorae tonkinensis* [J]. *Drug Eval Res*, 2025, 48(1): 100-109.
- [19] 杨杰, 嵇学武, 王鑫, 等. 木犀草素对口腔鳞状细胞癌迁移、侵袭、增殖和凋亡的影响 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(6): 1497-1506.
- Yang J, Zhuo X W, Wang X, et al. Effects of luteolin on migration, invasion, proliferation, and apoptosis of oral squamous cell carcinoma [J]. *Drug Eval Res*, 2025, 48(6): 1497-1506.
- [20] Chen R, Wu J, Lu C, et al. Systematic transcriptome analysis reveals the inhibitory function of cinnamaldehyde in non-small cell lung cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 611060.
- [21] 周凌, 伍津津, 鲁元刚, 等. 肉桂醛对黑素瘤 A375 细胞凋亡和 VEGF MMP-9 表达的影响 [J]. *中国皮肤性*

- 病学杂志, 2013, 27(8): 763-766, 791.
- Zhou L, Wu J J, Lu Y G, et al. Effect of cinnamic aldehyde on apoptosis and VEGF, MMP-9 expression in human melanoma A375 cells [J]. Chin J Dermatovenereology, 2013, 27(8): 763-766, 791.
- [22] 杜桑, 崔韶晖, 陈星妍, 等. 脂质体递药系统的靶向修饰 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(6): 1272-1285.
- Du S, Cui S H, Chen X Y, et al. Targeting modification of liposome drug delivery system [J]. Prog Biochem Biophys, 2023, 50(6): 1272-1285.
- [23] Sedaghat Doost A, Devlieghere F, Stevens C V, et al. Self-assembly of Tween 80 micelles as nanocargos for oregano and trans-cinnamaldehyde plant-derived compounds [J]. Food Chem, 2020, 327: 126970.
- [24] Wang Y L, Khan A, Liu Y X, et al. Chitosan oligosaccharide-based dual pH responsive nano-micelles for targeted delivery of hydrophobic drugs [J]. Carbohydr Polym, 2019, 223: 115061.
- [25] Mu Y X, Gong L D, Peng T J, et al. Advances in pH-responsive drug delivery systems [J]. OpenNano, 2021, 5: 100031.
- [26] Ha S H, Kwon K M, Park J Y, et al. Esculentoside H inhibits colon cancer cell migration and growth through suppression of *MMP-9* gene expression via NF- κ B signaling pathway [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 9810-9819.
- [27] Long H X, Xie R K, Xiang T, et al. Autocrine CCL5 signaling promotes invasion and migration of CD133⁺ ovarian cancer stem-like cells via NF- κ B-mediated MMP-9 upregulation [J]. Stem Cells, 2012, 30(10): 2309-2319.

[责任编辑 孙英杰]