

# 具有线粒体靶向性的雷公藤甲素 TPP-PEG-PCL 脂质体的制备及其促肝肿瘤细胞凋亡研究

王 锋<sup>1</sup>, 张 超<sup>2\*</sup>, 郑 栓<sup>1</sup>

1. 驻马店中心医院, 河南 驻马店 463000

2. 河南中医药大学研究生学院, 河南 郑州 450046

**摘要:**目的 成功制备雷公藤甲素(3-丙羧基)三苯基溴化磷(TPP)-聚乙二醇-b-聚己内脂(PEG-PCL)脂质体(Tr@TPP/Lip), 评价其靶向性及促肝肿瘤细胞凋亡效果。**方法** 采用正交试验优选 Tr@TPP/Lip 的制备工艺, 再研究该载药系统的粒径、Zeta 电位、载药量、包封率和多分散系数及透射电镜微观形态, 评价 Tr@TPP/Lip 的稳定性、溶血性、释放情况; 采用荧光试验, 研究脂质体与肝肿瘤细胞的融合情况、线粒体靶向性和肝脏靶向性; 在等剂量给药条件下, 评价 Tr@TPP/Lip 促肝癌细胞凋亡效果。**结果** 正交试验优选的 Tr@TPP/Lip 粒径为  $(113.5 \pm 17.6)$  nm, Zeta 电位  $(12.6 \pm 0.7)$  mV, 包封率为  $(71.3 \pm 3.2)\%$ , 载药量为  $(3.9 \pm 1.1)\%$ , 多分散系数为  $0.12 \pm 0.04$ ; 透射电子显微镜图片显示 Tr@TPP/Lip 呈规则圆球形, 该脂质体稳定性良好, 具有较小的溶血率和良好的缓释药物性能; 荧光试验结果显示, TPP 阳离子能促进脂质体与肿瘤细胞的融合, 并靶向线粒体, 还能提高药物在肝肿瘤部位的靶向和滞留效果; 细胞药效结果显示, Tr@TPP/Lip 具有良好的促肝肿瘤细胞凋亡效果, 能明显降低线粒体膜 Zeta 电位、增加细胞内活性氧水平和 Caspase-3 的释放, 显著增加促凋亡蛋白 Bcl-2、减少抗凋亡 Bax 蛋白的表达, 这些细胞凋亡试验结果均明显优于雷公藤甲素普通脂质体和雷公藤甲素。**结论** Tr@TPP/Lip 具有较好的线粒体靶向功能, 能增强药物促肝肿瘤细胞凋亡效果。

**关键词:** 雷公藤甲素; 正交试验; 细胞凋亡; TPP-PEG-PCL; 线粒体靶向; 脂质体; 肝肿瘤; 溶血性; 缓释; 活性氧; Caspase-3; Bcl-2; Bax

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)24-7473-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.009

## Preparation of triptolide TPP-PEG-PCL liposomes with mitochondrial targeting and its promotion apoptosis of hepatic tumor cells

WANG Feng<sup>1</sup>, ZHANG Chao<sup>2</sup>, ZHENG Shuan<sup>1</sup>

1. Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

2. Graduate School of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

**Abstract: Objective** To prepare triptolide TPP-PEG-PCL liposomes and evaluate its mitochondrial targeting and hepatic tumor cell apoptosis promoting effect. **Methods** Orthogonal test was used to optimize the preparation process of triptolide TPP-PEG-PCL liposomes, and the particle size, Zeta potential, drug loading capacity, encapsulation rate, polydispersion coefficient and transmission electron microscope morphology of the drug delivery system were studied. The stability, hemolysis and release of triptolide TPP-PEG-PCL liposomes were evaluated. Fluorescence test was used to study the fusion of liver tumor cells and liposomes, mitochondrial targeting and *in vivo* liver targeting. Under the conditions of equal dose administration, the effect of triptolide TPP-PEG-PCL liposomes on promoting apoptosis of liver cancer cells was evaluated. **Results** The particle size of triptolide TPP-PEG-PCL liposomes was  $(113.5 \pm 17.6)$  nm, Zeta potential was  $(12.6 \pm 0.7)$  mV, encapsulation rate was  $(71.3 \pm 3.2)\%$ , drug loading was  $(3.9 \pm 1.1)\%$  and polydispersity index was  $0.12 \pm 0.04$ . Transmission electron microscopy pictures showed that triptolide TPP-PEG-PCL liposomes were in regular round spheres. The liposomes had good stability, low hemolysis rate and good sustained-release drug properties; Fluorescence test results showed that TPP cations could promote the fusion of liposomes and tumor

收稿日期: 2021-06-01

基金项目: 河南中医药大学博士科研基金资助项目(2017023); 2017年全国名老中医药专家传承工作室建设项目(豫中医科教[2018]19)

作者简介: 王 锋, 主治中医师, 研究方向中药分子的靶向构建与评价。E-mail: 15978863102@163.com

\*通信作者: 张 超, 副教授, 博士。E-mail: 378745364@qq.com

cells, and target mitochondria, and could also improve the targeting and retention of drugs in liver tumors. The cell efficacy results showed that triptolide TPP-PEG-PCL liposomes had a good effect on promoting liver tumor cell apoptosis, and significantly reduced the mitochondrial membrane potential, increased the level of intracellular ROS and the release of Caspase-3 significantly, increased the expression of pro-apoptotic protein Bcl-2 and decreased the expression of anti-apoptotic Bax protein. The results of these apoptosis tests were significantly better than that of triptolide liposomes and triptolide. **Conclusion** Triptolide TPP-PEG-PCL liposomes had a good mitochondrial targeting function and can enhance the effect of drugs on promoting liver tumor cell apoptosis.

**Key words:** triptolide; orthogonal experiment; cell apoptosis; TPP-PEG-PCL; mitochondrial targeting; liposomes; hepatic tumor; hemolysis; sustained release; active oxygen; Caspase-3; Bcl-2; Bax

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤之一，死亡率在恶性肿瘤中位居第3位，目前开展的治疗策略有手术切除、肝动脉栓塞、肝移植、化疗及中药联合治疗等<sup>[1-2]</sup>。传统的化疗容易带来高复发、多药耐药和严重的不良反应等，故很多晚期肝癌患者治疗效果并不满意<sup>[3]</sup>。

中药具有多成分、多靶点联合治疗的优势，目前正逐渐成为治疗肝癌新的研究方向<sup>[4-5]</sup>。雷公藤甲素 (triptolide, Tr) 是从卫矛科雷公藤属植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 中分离得到的二萜三环氧化物，目前，发现它对肝癌、胰腺癌、子宫癌和胆管癌等多种恶性肿瘤均具有很好的疗效<sup>[6-7]</sup>。大量研究证实，Tr 可以通过调控细胞线粒体相关因子，引起线粒体生物功能改变，升高细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平<sup>[8-9]</sup>，诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[10-11]</sup>。但该药物分子存在水溶性差和毒性大等问题<sup>[12]</sup>，严重限制了该药物在临床上的应用。因此，有必要构建一种新型药物载体，增强 Tr 的水溶性，降低该药物的毒副作用，同时精准将药物递送到肿瘤部位的线粒体，充分发挥制剂减毒增效的优势，将来更好的用于肝癌的治疗。

脂质体可将药物包载于磷脂双分子层内而形成微型泡囊体，不仅能明显增强药物的水溶性，改善药物的生物相容性，还能通过高分子材料的进一步修饰，增强脂质体的靶向性，目前已广泛应用于肿瘤药物的靶向递送<sup>[13]</sup>。(3-丙羧基)三苯基溴化磷 [(3-carboxypropyl) triphenylphosphonium bromide, TPP] 属于阳离子，容易被带负电荷线粒体膜所吸引，常用来介导肿瘤药物载体靶向递送至线粒体，提高药物的选择性，发挥细胞器靶向给药的优势，增强药物的抗肿瘤效果<sup>[14-15]</sup>。因此，本研究在文献报道<sup>[16]</sup>的基础上，拟采用 TPP 阳离子修饰脂质体，预设计将 Tr 递送到肝癌细胞线粒体的雷公藤甲素 TPP-PEG-PCL 脂质体 (Tr@TPP/Lip)，精确调节线粒体功能，增强药物促肿瘤细胞凋亡效果。

## 1 材料与仪器

### 1.1 试药

Tr 原料药，质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 20201107，成都德思特生物科技有限公司；大豆磷脂，批号 20200711，德国 Lipoid 公司；胆固醇，质量分数 $\geq 95\%$ ，批号 20201108，北京百灵威科技有限公司；氨基聚乙二醇聚己内酯高分子聚合物 (PCL-PEG-NH<sub>2</sub>)，PEG 相对分子质量 2000，质量分数 $\geq 90\%$ ，批号 20191205，西安瑞禧生物科技有限公司；香豆素 6 荧光染料 (coumarin 6, C6)，质量分数 $\geq 90\%$ ，批号 20200917，西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司；DIR 荧光染料，批号 20201022，苏州宇恒生物科技有限公司；线粒体荧光染料 (MitoTracker™ Red)，批号 20201009，上海联迈生物工程有限公司；细胞核 Hoechst 33258 染料，批号 20201117，上海碧云天生物技术有限公司；TPP (批号 20201022)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC-HCl，批号 20200917)，上海麦克林生化科技有限公司；N-羟基丁二酰亚胺 (NHS)，批号 20201106，上海共价化学科技有限公司；甲醇、乙腈，色谱级，美国 Fisher 化学试剂公司。

### 1.2 细胞株、培养基及动物

人肝癌细胞株 SMMC-7721，中科院上海细胞生物学研究所；美国 Gibco 16000-044 胎牛血清，特级 FBS，上海联硕生物科技有限公司；BALB/c nude (裸鼠)，河南中医药大学动物实验中心。所有动物实验遵循河南中医药大学有关实验动物管理和使用的规定，均符合 3R 原则。

### 1.3 仪器

Zetasizer Nano ZSP 纳米粒度 Zeta 电位仪，英国马尔文公司；OLS5000 型激光共聚焦显微镜，奥林巴斯北京销售有限公司；JEM-2100 型透射电子显微镜 (TEM)，日本电子株式会社；TG19 型台式高速离心机，上海卢湘仪离心机仪器有限公司；ESJ60-5A 型电子分析天平，上海精密仪器有限公

司; Aglient 1200 高效液相色谱仪, 安捷伦科技(中国)有限公司; Multiskan SkyHigh 型全波长酶标仪, 赛默飞世尔科技公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 TPP-PEG-PCL 的合成

精密称取 80 mg TPP、75 mg EDC、70 mg NHS 置于 10 mL 二孔圆底烧瓶中, 加入 3 mL 二氯甲烷促使三者溶解, 添加 30  $\mu$ L 三乙胺, 向其中一孔通入氩气, 然后再用塞子堵住另一孔, 室温下搅拌 5 h, 然后加入 120 mg PCL-PEG-NH<sub>2</sub>, 再添加 2 mL 二氯甲烷, 室温继续搅拌过夜, 然后将其转移到透析袋(截留相对分子质量 3000)中透析 12 h, 纯化样品, 最后将透析袋中内容物转移至烧杯中, 进行冷冻干燥, 即可获得 TPP-PEG-PCL。经 <sup>1</sup>H-NMR (图 1) 验证, 化学位移  $\delta$  7~8 的为 TPP 阳离子的 3 个联苯峰, 化学位移  $\delta$  3.5 为 PEG 的单甲醚特征峰, 化学位移  $\delta$  1.2 为 PCL 烷基氢特征峰, 由此表明, TPP-PEG-PCL 已经成功合成。

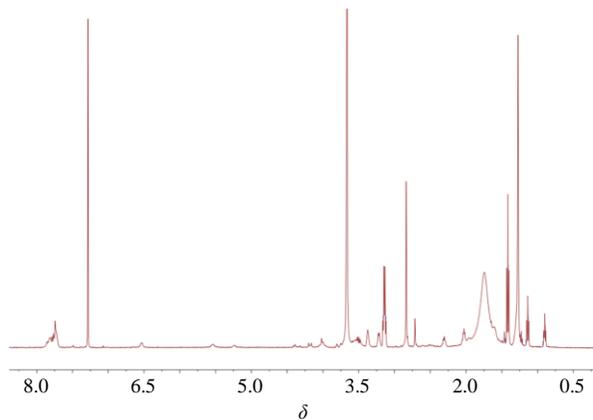


图 1 <sup>1</sup>H-NMR 验证 TPP-PEG-PCL 的合成

Fig. 1 Synthesis of TPP-PEG-PCL verified by <sup>1</sup>H-NMR

### 2.2 Tr@TPP/Lip 的制备

精密称取 Tr 30 mg、大豆磷脂和胆固醇适量, TPP-PEG-PCL 20 mg, 置于茄型瓶中, 加入 20 mL 色谱甲醇促进溶解, 使用旋转蒸发器设置适量转速减压浓缩成膜除去有机溶剂, 然后再冷冻干燥过夜, 尽量除去残留有机溶剂, 加入适量的蒸馏水或磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS), 于适量温度水浴轻微振摇 30 min 进行水化, 再超声处理 5 min, 促进脂质体分散, 然后过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜, 再转移到 Avanti 脂质体挤压器中, 以 100 nm 的膜来回挤压 20 次左右, 即可获得粒径均匀分布的 Tr@TPP/Lip 溶液。

### 2.3 粒径分布、Zeta 电位测定和 TEM 分析

吸取 Tr@TPP/Lip, 采用蒸馏水稀释 10 倍左右, 以 Zetasizer Nano ZS 纳米粒度 Zeta 电位仪测定粒径、Zeta 电位分布; 采用移液枪吸取大约 100  $\mu$ L Tr@TPP/Lip, 滴加在 200 目铜网上, 采用洗耳球吹干, 再滴加微量 0.5% 磷钨酸进行复染, 低温吹干溶液, 在 TEM 下观察脂质体的微观形态。

### 2.4 包封率及载药量测定

**2.4.1 色谱条件**<sup>[17]</sup> Phenomenex Hyper Clore BDS C<sub>18</sub> 分析柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 柱温为 30  $^{\circ}$ C; 流动相为乙腈-水 (33 : 67); 体积流量为 1 mL/min, 检测波长为 218 nm; 进样体积为 10  $\mu$ L。

**2.4.2 包封率和载药量测定** 吸取 Tr@TPP/Lip 溶液 500  $\mu$ L, 置于超滤离心管 (截留相对分子质量 3000) 中, 以 15 000 r/min 高速离心 10 min, 将离心管外游离的药物定容到 5 mL, 即为  $M_{外}$ , 将最初吸取的 500  $\mu$ L Tr@TPP/Lip 溶液也定容到 5 mL, 即为  $M_{总}$ , 采用 HPLC 测定以上样品中 Tr 的含量, 按照公式计算包封率。

将离心管内的药物进行冷冻干燥成粉末, 精密称定质量, 再采用 HPLC 测定冻干后脂质体中 Tr 含量, 计算载药量。

$$\text{包封率} = (M_{总} - M_{外}) / M_{总}$$

$$\text{载药量} = M_{内} / M$$

$M_{外}$  为离心后游离 Tr 质量,  $M_{总}$  为脂质体中 Tr 质量,  $M_{内}$  为离心后脂质体中 Tr 质量,  $M$  为 Tr@TPP/Lip 质量

### 2.5 正交试验优选 Tr@TPP/Lip 的制备工艺

按表 1 设定的因素、水平设计正交试验, 考察脂质体制备工艺研究中大豆卵磷脂和胆固醇投料比 (A)、旋转转速 (B)、水化温度 (C) 这 3 个因素, 以脂质体粒径、包封率和载药量为指标, 参照文献方法进行综合评分<sup>[11]</sup>, 满分为 100 分, 粒径占 50%, 以最小粒径者为满分 50 分, 包封率和载药量各占 25%, 以最高包封率和载药量为满分 25 分, 优选 Tr@TPP/Lip 制备过程中的上述考察因素, 结果如表 1 显示, 方差分析结果见表 2, 极差结果提示, 3 个因素对结果影响的大小顺序为 A > C > B, 最终优选的条件为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>, 即大豆卵磷脂和胆固醇投料比例为 80 : 35, 转速为 110 r/min, 水化温度为 40  $^{\circ}$ C。

$$\text{综合评分} = \text{粒径最小值} / \text{粒径} \times 50 + \text{载药量} / \text{载药量最大值} \times 25 + \text{包封率} / \text{包封率最大值} \times 25$$

### 2.6 Tr@TPP/Lip 的形态表征

采用上述优选的工艺条件, 制备 3 批 Tr@TPP/

表 1 正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal test design and results

试验号	A	B/(r·min <sup>-1</sup> )	C/°C	D(空白)	粒径/nm	载药量/%	包封率/%	综合评分
1	80 : 20 (1)	70 (1)	25 (1)	(1)	139	5.7	43.9	71.8
2	80 : 20 (1)	90 (2)	40 (2)	(2)	134	6.3	76.9	84.8
3	80 : 20 (1)	110 (3)	55 (3)	(3)	119	6.5	42.7	80.9
4	80 : 35 (2)	70 (1)	40 (2)	(3)	113	7.3	69.0	93.6
5	80 : 35 (2)	90 (2)	55 (3)	(1)	116	7.5	64.7	91.7
6	80 : 35 (2)	110 (3)	25 (1)	(2)	126	7.7	62.6	87.9
7	80 : 50 (3)	70 (1)	55 (3)	(2)	133	6.8	44.5	77.4
8	80 : 50 (3)	90 (2)	25 (1)	(3)	129	6.1	42.0	75.7
9	80 : 50 (3)	110 (3)	40 (2)	(1)	137	6.6	86.8	87.7
K <sub>1</sub>	237.5	242.8	235.4	251.2				
K <sub>2</sub>	273.2	252.2	266.1	250.1				
K <sub>3</sub>	240.8	256.5	250.0	250.2				
R	35.7	13.7	30.7	1.1				

表 2 方差分析结果

Table 2 Variance analysis results

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	259.460 0	2	1 051.884 9	P<0.01
B	32.726 7	2	132.675 7	P<0.01
C	157.206 7	2	637.324 3	P<0.01
D(误差)	0.246 7	2		

F<sub>0.01(2, 2)</sub>=99.00

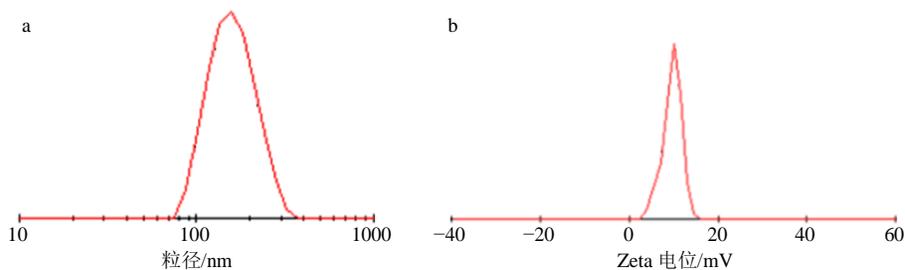


图 2 Tr@TPP/Lip 的粒径分布 (a)、Zeta 电位 (b) 和 TEM 图 (c)

Fig. 2 Particle size (a), Zeta potential (b) and TEM picture (c) of Tr@TPP/Lip

(108.4±15.6) nm, Zeta 电位为 (-10.8±0.6) mV, 包封率为 (79.6±4.5) %, 载药量为 (4.1±1.2) %, PDI 为 0.11±0.05。

### 2.7 稳定性考察

**2.7.1 存储稳定性试验** 将 Tr@TPP/Lip 于 4 °C 冰箱中保存 60 d, 然后每隔 10 d 检测该脂质体的粒径、Zeta 电位、载药量和包封率。由表 3 可知, Tr@TPP/Lip 在放置 60 d 的粒径、Zeta 电位载药量和包封率波动不大, 基本与最初保持一致, 由此表明, Tr@TPP/Lip 在 4 °C 冰箱中稳定性良好。

Lip, 按照“2.3”项方法进行测定, 结果见图 2。Tr@TPP/Lip 的平均粒径为 (113.5±17.6) nm, Zeta 电位为 (12.6±0.7) mV; TEM 图显示, Tr@TPP/Lip 呈规则圆球形, 分散性良好。Tr@TPP/Lip 包封率为 (71.3±3.2) %, 载药量为 (3.9±1.1) %, 多分散系数 (PDI) 为 0.12±0.04。采用同样质量的 Tr、大豆磷脂和胆固醇, 以薄膜水化法制备 Tr 普通脂质体 (Tr@Lip) [18], 经测定 Tr@Lip 的平均粒径为

表 3 Tr@TPP/Lip 的存储稳定性

Table 3 Storage stability of Tr@TPP/Lip

存储时间/d	平均粒径/nm	Zeta 电位/mV	载药量/%	包封率/%
10	114.7±11.6	13.9±1.1	3.9±1.2	78.4±3.8
20	125.7±19.8	12.8±0.8	4.1±0.9	79.2±4.1
30	115.6±16.5	13.7±1.2	3.8±1.1	77.8±4.5
40	118.7±15.8	12.7±0.7	4.2±1.1	76.9±4.3
50	127.3±14.7	12.9±1.3	3.9±0.8	77.6±5.5
60	124.5±10.8	11.6±0.9	3.8±1.1	77.2±3.9

**2.7.2 血清稳定性** 将 Tr@TPP/Lip 与 10%胎牛血清于 37 °C 条件下进行孵育 24 h, 然后每隔 4 h 将其取出, 采用 15 000 r/min 离心 5 min, 除去胎牛血清的干扰, 吸取上清液检测脂质体的粒径、Zeta 电位、载药量和包封率。由表 4 可知, Tr@TPP/Lip 在与血清孵育 24 h 期间, 粒径和 Zeta 电位变化也不明显, 粒径比未孵育前的脂质体稍微增大, 可能在检测过程中有少量血清蛋白吸附所致, 载药量和包封率也未见明显变化, 由此提示, Tr@TPP/Lip 在与血清孵育过程中能基本上保持固有的脂质体结果, 稳定性良好。

表 4 Tr@TPP/Lip 血清稳定性  
Table 4 Serum stability of Tr@TPP/Lip

孵育时间/h	平均粒径/nm	Zeta 电位/mV	载药量/%	包封率/%
4	123.9±18.9	12.4±1.1	4.1±1.1	76.9±4.4
8	135.7±17.8	13.1±0.8	3.9±0.8	78.7±3.5
12	138.6±13.7	12.8±1.2	3.9±1.2	78.4±3.6
16	131.5±14.8	13.4±0.8	3.8±1.2	76.4±3.5
20	136.3±15.5	13.8±1.1	4.3±1.3	76.4±4.9
24	134.5±12.7	13.6±1.3	4.2±0.9	75.7±4.2

**2.8 溶血试验考察**

吸取 Tr@TPP/Lip 适量体积, 依次用 PBS 稀释成质量浓度为 800、400、200、100、50、25 ng/mL 的系列溶液, 将其等体积的 10%红细胞悬液混合, 以生理盐水为阴性对照, 蒸馏水为阳性对照, 放置于 37 °C 生化培养箱中孵育 2 h, 然后将其取出, 以 2500 r/min 离心 5 min, 下层为血细胞, 采用移液枪吸取上层, 转移到 96 孔酶标板, 于 540 nm 采用酶标仪测定吸光度 (A), 计算溶血率, 平行 3 份。结果见图 3, Tr@TPP/Lip 和 Tr@Lip 溶血率都保持在 5% 以下。由此表明, Tr@TPP/Lip 具有很好的血液相容性, 溶血率相对较小。

溶血率=(样品管 A 值-阴性对照管 A 值)/(阳性对照管 A 值-阴性对照管 A 值)

**2.9 Tr@TPP/Lip 的体外释放**

取 Tr、Tr@Lip、Tr@TPP/Lip (三者均含 200 μg Tr) 分别置于 Spectrum Labs 透析袋 (截留相对分子质量为 3000) 中, 两端以塑料夹封闭, 将透析袋置于 50 mL pH 7.4 PBS 和 pH 5 PBS 缓冲液中, 添加 0.1% 聚山梨酯 80 作为表面活性剂促进释放出 Tr 的溶解, 搅拌快速分散。设置水温为 37 °C, 采用磁力搅拌器, 设置转速为 150 r/min, 于预定时间点 (2、

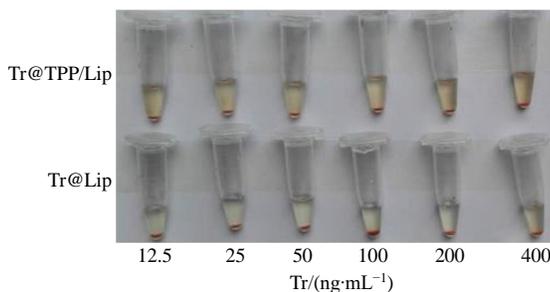
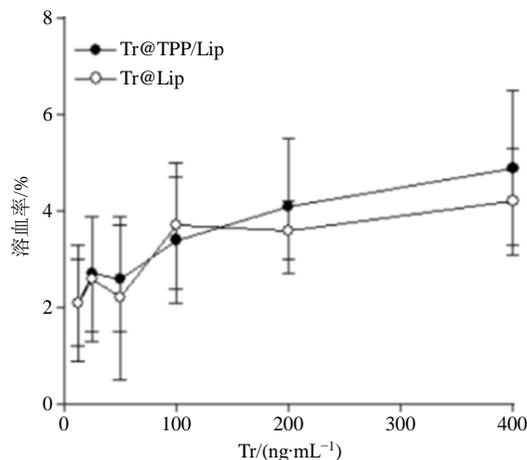


图 3 Tr@TPP/Lip 和 Tr@Lip 的溶血率

Fig. 3 Hemolysis rate of Tr@TPP/Lip and Tr@Lip

4、8、10、12、24、36、48 h), 采用移液枪吸取 200 μL 至进样瓶中内衬管中, 同时补充相应体积的 PBS, 检测释放的 Tr 含量, 计算累积释放率。实验结果如图 4 所示, pH 7.4 PBS 条件下, 游离 Tr 表现为快速释放状态, 12 h 释放量达 86% 以上, Tr@TPP/Lip 和 Tr@Lip 最初释放较快, 后面释放缓慢, 由此表明, Tr@TPP/Lip 具有较好的缓释性能; pH 5.0 PBS 条件下, Tr@TPP/Lip 和 Tr@Lip 也表现为缓释趋势, 但释放速率明显快于 pH 7.4 条件, 鉴于肿瘤部位的酸性环境, 有助于药物在肿瘤部位的快速释放, 发挥药物达到抗肿瘤效果。

$$E_r = (V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n) / m$$

$E_r$  为药物累积释放率,  $V_e$  为 PBS 的置换体积,  $V_0$  为释放介质总体积,  $C_i$  为第  $i$  次置换取样时释放液的浓度,  $m$  为纳米粒子所载药物总质量,  $n$  为置换 PBS 的次数

**2.10 细胞融合**

考虑到 Tr 无荧光, 本研究采用带绿色荧光的 C6 作为表征药物, 按照上述方法载入脂质体中, 获得 C6@Lip 和 C6@TPP/Lip。人肝癌细胞 SMMC-7721 接种于 12 孔培养板中, 将细胞在胎牛血清中进行培养 24 h, 然后与 C6@Lip 和 C6@TPP/Lip 共同孵育, 其中 C6 在细胞培养液中的质量浓度为

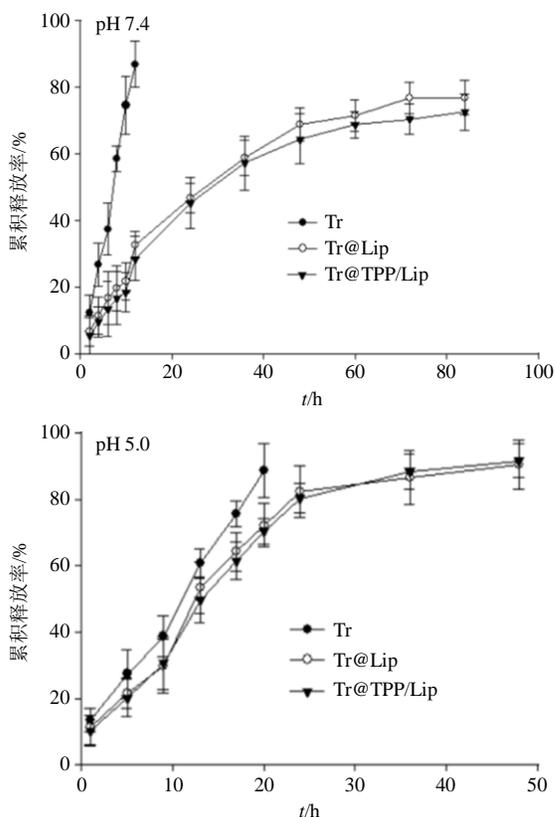


图 4 Tr@TPP/Lip、Tr@Lip 和 Tr 的体外释放对比研究 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Comparative study on *in vitro* release of Tr@TPP/Lip, Tr@Lip and free triptolide ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

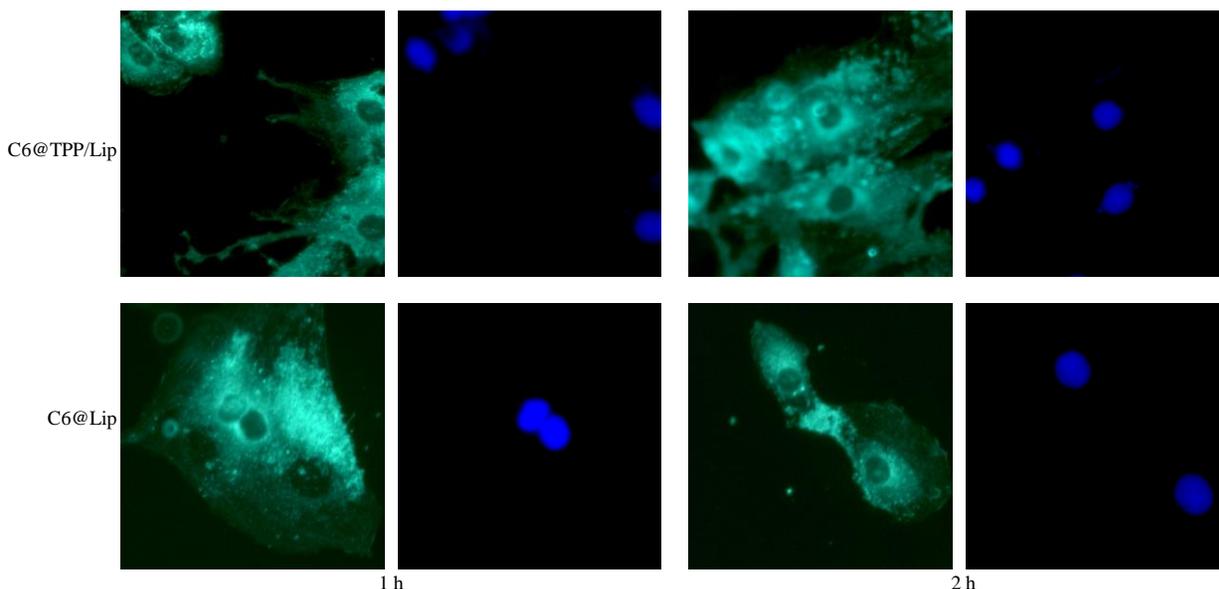


图 5 不同时间点人肝癌细胞 SMMC-7721 与脂质体的融合情况

Fig. 5 Fusion of human liver cancer cell SMMC-7721 and liposomes

5 min, 然后置激光共聚焦显微镜下, 观察脂质体在细胞内的定位及分布情况, 结果见图 6。带绿色荧光的脂质体进入细胞后, 与红色线粒体重合后, 变为黄色, C6@TPP/Lip 的黄色面积明显高于 C6@Lip。

100 ng/mL, 孵育时间为 1、2 h, 收集细胞, 采用 PBS 多次洗涤除去吸附在细胞外的 C6, 然后吸取少量转移至载玻片上, 采用 5% 多聚甲醇进行固定, 以 1 mg/mL Hoechst 33342 染细胞核 (蓝色) 5 min, 再置激光共聚焦显微镜下, 观察带绿色的脂质体与细胞核的重合情况, 以 Image J 数据软件计算各组的泊桑分布值, 由此判断脂质体是否被细胞摄取。结果见图 5 和表 5。荧光结果 (图 5) 显示, C6@TPP/Lip 进入细胞后, 能快速聚集在细胞核周围, 细胞核周围呈明亮的绿色, 明显强于 C6@Lip; 表 5 泊桑分布数值结果也表明, C6@TPP/Lip 显著高于 C6@Lip, 两者存在显著性差异。由此推断, TPP 阳离子能促进脂质体的细胞摄取, 促进药物载体与肿瘤细胞的融合, 该实验结果一方面取决于脂质体的磷脂双分子层能与细胞膜很好的融合, 另一方面借助于 TPP 阳离子的跨膜转运<sup>[15]</sup>, 有助于增强药物载体的细胞摄取。

### 2.11 线粒体靶向

按照以上处理程序将人肝癌 SMMC-7721 细胞进行培养, 采用 C6@Lip 和 C6@TPP/Lip 共同孵育 2 h, 然后将细胞取出, 以 5% 多聚甲醇进行固定细胞, 添加 50 nmol/L MitoTracker™ RED 染线粒体 (红色) 5 min, 1 mg/mL Hoechst 33342 染细胞核 (蓝色)

采用 Image J 数据软件计算 2 组的泊桑分布值, C6@TPP/Lip ( $0.727 \pm 0.028$ ) 显著高于 C6@Lip ( $0.412 \pm 0.032$ ), 2 组比较具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。据此推断, TPP 阳离子可以促进脂质体靶向线粒体。

表5 C6@Lip 和 C6@TPP/Lip 的泊桑分布值 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Poisson distribution of C6@Lip and C6@TPP/Lip

( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	泊桑分布值	
	1 h	2 h
C6@Lip	0.28±0.07	0.34±0.13
C6@TPP/Lip	0.56±0.16**	0.68±0.11**

与 C6@Lip 组比较: \*\* $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs C6@Lip group

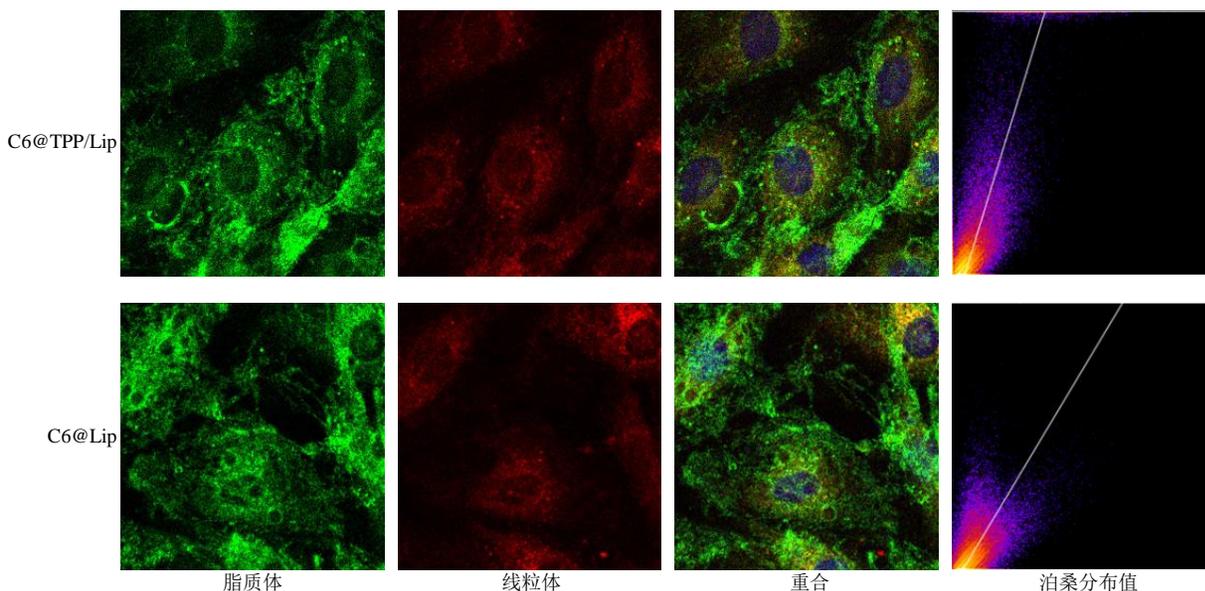


图6 C6@TPP/Lip 与 C6@Lip 的线粒体靶向性和泊桑分布系数

Fig. 6 Mitochondrial targeting and Poisson distribution coefficient of C6@TPP/Lip and C6@Lip

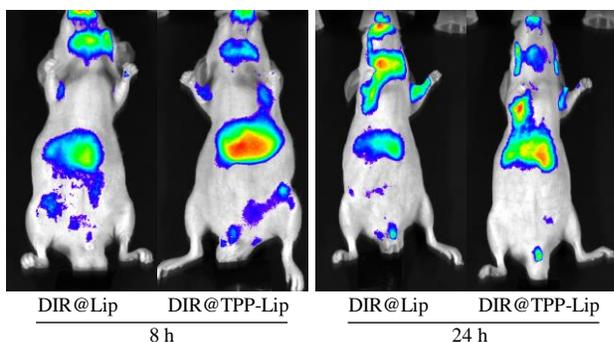


图7 DIR@TPP/Lip 与 DIR@Lip 在肿瘤模型体内的肝靶向性

Fig. 7 Liver targeting of DIR@TPP/Lip and DIR@Lip in tumor model

TPP/Lip 在 24 h 时, 肝脏部位还有较强的荧光强度, 具有一定的滞留效应。由此表明, TPP 阳离子可以促进脂质体靶向聚集在肝脏部位, 并且消除也相对较慢。

### 2.13 肿瘤细胞凋亡

#### 2.13.1 细胞培养 人肝癌细胞 SMMC-7721 接种于

### 2.12 肝肿瘤靶向

采用荧光染料 DIR 包载于脂质体中, 制成 DIR@TPP/Lip 和 DIR@Lip 2 种脂质体, 将人肝癌细胞 SMMC-7721 接种在裸鼠肝脏部位制成肝肿瘤模型, 然后将 DIR@TPP/Lip 和 DIR@Lip 以尾静脉的形式注射肝肿瘤模型裸鼠, 采用小动物活体成像仪观察给药后 8、24 h 时肝脏部位的荧光强度, 结果见图 7, DIR@TPP/Lip 肝脏部位平均荧光强度明显高于 DIR@Lip, 两者存在显著性差异, DIR@

表6 DIR@TPP/Lip 与 DIR@Lip 肝脏平均荧光强度 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Liver average fluorescence intensity of DIR@TPP/Lip and DIR@Lip ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	肝脏平均荧光强度/( $\times 10^5$ au)	
	8 h	24 h
DIR@Lip	5.41±0.61	0.78±0.09
DIR@TPP/Lip	9.27±0.42##	1.54±0.23##

与 DIR@Lip 组比较: ## $P < 0.01$

## $P < 0.01$  vs DIR@Lip group

24 孔培养皿中, (密度约为  $1 \times 10^6$  个/mL), 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养。

2.13.2 细胞存活率测定 将药物组 Tr、Tr@Lip、Tr@TPP/Lip 与人肝癌细胞 SMMC-772 共同孵育, 并设定系列药物浓度分别为 10、30、50、70、90、130、170、210 nmol/L, 平行 3 份样品。孵育 24 h, 加入 5 mg/mL MTT 100  $\mu$ L, 继续避光孵育 4 h, 随后加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砜, 轻微振荡 10 min, 采用

酶标仪于 570 nm 波长下检测各组的 A 值, 以 PBS 作为空白对照, 按公式计算各组的细胞存活率, 根据存活率拟合公式计算各组的计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。

细胞存活率 = 加药组 A 值 / 空白对照组 A 值

试验结果如表 7 所示, Tr@TPP/Lip 对于肿瘤细

胞的抑制效果最显著, 明显优于 Tr、Tr@Lip, 尤其在高浓度下表现最为突出, 经计算给药组中 Tr@TPP/Lip 的 IC<sub>50</sub> 最小, 与其他 2 组比较存在显著性差异, 该实验结果表明, TPP-PEG-PCL 脂质体能明显增强药物的抗肿瘤细胞生长作用。

**2.13.3 细胞凋亡率** 将 Tr、Tr@Lip、Tr@TPP/Lip

表 7 Tr@TPP/Lip、Tr@Lip 与 Tr 的细胞存活率和 IC<sub>50</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 7 Cell survival rate and IC<sub>50</sub> of Tr@TPP/Lip, Tr@Lip and Tr ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	细胞存活率/%									IC <sub>50</sub> / (nmol·L <sup>-1</sup> )
	10 nmol·L <sup>-1</sup>	30 nmol·L <sup>-1</sup>	50 nmol·L <sup>-1</sup>	70 nmol·L <sup>-1</sup>	90 nmol·L <sup>-1</sup>	130 nmol·L <sup>-1</sup>	170 nmol·L <sup>-1</sup>	210 nmol·L <sup>-1</sup>		
对照	99.4±0.6	98.7±0.3	98.9±0.8	97.8±0.5	98.2±0.8	98.5±0.7	98.3±0.2	98.3±0.8	-	
Tr	90.4±0.3	85.3±0.7	82.4±0.9	78.6±0.3	61.8±0.3	56.8±0.4	51.7±0.3	48.2±0.7	149.5±6.8	
Tr@Lip	86.7±0.4	82.3±0.4	75.8±0.6	62.6±0.5	50.7±0.6	46.3±0.2	42.5±0.8	39.7±0.4	102.8±6.2 <sup>##</sup>	
Tr@TPP-Lip	80.3±0.7	76.3±0.3	61.4±0.3	52.8±0.5	45.6±0.7	37.5±0.3	35.4±0.5	25.7±0.9	62.4±4.3 <sup>###</sup>	

与 Tr@Lip 组比较: <sup>\*\*</sup>P<0.01; 与 Tr 组比较: <sup>##</sup>P<0.01

<sup>\*\*</sup>P<0.01 vs Tr@Lip group; <sup>##</sup>P<0.01 vs Tr group

与人肝癌细胞 SMMC-772 共同孵育, 设定给药剂量为 80 nmol/L, 孵育 24 h 后, 采用流式细胞仪以 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测肿瘤细胞凋亡率。以添加 PBS (不含药物) 作为对照, 其余同以上处理, 通过统计软件处理, 计算各组的肿瘤细胞凋亡率 (早期凋亡率和晚期凋亡率之和), 结果见表 8, Tr@TPP/Lip 的肿瘤细胞凋亡率最高, 与其余 2 组比较, 均存在显著性差异, 由此表明, Tr@TPP/Lip 具有很好的促肿瘤细胞凋亡效果。

表 8 Tr@TPP/Lip、Tr@Lip 与 Tr 的肿瘤细胞凋亡率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 8 Tumor cell apoptosis rate of Tr@TPP/Lip, Tr@Lip and Tr ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(nmol·L <sup>-1</sup> )	肿瘤细胞凋亡率/%
对照	-	3.2±0.7
Tr	80	13.2±0.6
Tr@Lip	80	21.4±0.8 <sup>#</sup>
Tr@TPP-Lip	80	27.8±0.3 <sup>*#</sup>

与 Tr@Lip 组比较: <sup>\*</sup>P<0.05; 与 Tr 组比较: <sup>#</sup>P<0.05

<sup>\*</sup>P<0.05 vs Tr@Lip group; <sup>#</sup>P<0.05 vs Tr group

**2.13.4 线粒体膜电位** 将 Tr、Tr@Lip、Tr@TPP/Lip 与人肝癌细胞 SMMC-772 共同孵育, 设定给药剂量为 80 nmol/L, 孵育 24 h 后, 加入 2 μL JC-1 (5 μg/mL) 染色液, 与细胞悬液均匀悬浮, 继续在 37 °C 培养箱中孵育 20 min, 再以 1500 r/min 转速离心 5 min, 收集细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 采用移液枪吸取 200 μL 细胞悬液, JC-1 检测试剂在正常细胞中发红色

荧光, 在凋亡细胞中发绿色荧光, 采用流式细胞仪检测红/绿荧光强度的比值可以定量检测病变线粒体的比例。以添加 PBS (不含药物) 作为对照, 其余同以上处理。结果见表 9, 以对照组红/绿荧光强度比值为基准, 给药组的该比值与对照组进行比较, Tr@TPP/Lip 组的荧光比值最小, 促进肿瘤细胞凋亡效果最显著。

表 9 Tr@TPP/Lip、Tr@Lip 与 Tr 促肝肿瘤细胞凋亡的线粒体膜电位比值 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 9 Mitochondrial membrane potential ratio of Tr@TPP/Lip, Tr@Lip and Tr promoting apoptosis of liver tumor cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ (nmol·L <sup>-1</sup> )	荧光强度/(×10 <sup>5</sup> au)		线粒体膜电位 比值/%
		红色	绿色	
对照	-	7.6±0.5	1.3±0.4	98.7±2.1
Tr	80	5.7±0.3	2.1±0.8	78.4±4.3
Tr@Lip	80	5.2±0.8	2.8±0.5	60.8±5.5 <sup>*#</sup>
Tr@TPP-Lip	80	4.0±0.2	3.2±0.4	52.5±4.1 <sup>*#</sup>

与 Tr@Lip 组比较: <sup>\*</sup>P<0.05; 与 Tr 组比较: <sup>#</sup>P<0.05, 表 10 同

<sup>\*</sup>P<0.05 vs Tr@Lip group; <sup>#</sup>P<0.05 vs Tr group, same as table 10

**2.13.5 DCFH-DA 染色检测胞内 ROS 水平** 将 Tr、Tr@Lip、Tr@TPP/Lip 与人肝癌细胞 SMMC-772 共同孵育, 设定给药剂量为 80 nmol/L, 孵育 24 h 后, 加入浓度为 10 μmol/L 的 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 孵育 30 min, 然后以 PBS 洗涤 3 次, 除去细胞表面残留的 DCFH-DA, 以流式细胞技术检测各组 DCF 荧光的强度值, 体现细胞内 ROS 水

平。以添加 PBS（不含药物）作为对照，其余同以上处理。结果见表 10，雷公藤甲素 TPP-PEG-PCL 预处理后，可以明显提高细胞内 ROS 水平，激活线粒体信号通路，促进肿瘤细胞的大量凋亡。

表 10 Tr@TPP/Lip、Tr@Lip 与 Tr 促肝肿瘤细胞凋亡的 DCF 荧光强度和 Caspase-3 活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 10 DCF fluorescence intensity and Caspase-3 activity of Tr@TPP/Lip, Tr@Lip and Tr promoting apoptosis of liver tumor cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ (nmol·L <sup>-1</sup> )	荧光强度/ (×10 <sup>6</sup> au)	Caspase-3 活性
对照	-	0.92±0.07	0.96±0.16
Tr	80	1.24±0.24	2.16±0.19
Tr@Lip	80	1.89±0.17 <sup>#</sup>	3.06±0.21 <sup>#</sup>
Tr@TPP-Lip	80	2.85±0.16 <sup>*#</sup>	4.01±0.14 <sup>*#</sup>

**2.13.6 Caspase-3 活性** 将 Tr、Tr@Lip、Tr@TPP/Lip 与人肝癌细胞 SMMC-772 共同孵育，设定每孔中药物浓度为 80 nmol/L，孵育 24 h 后，弃去培养液。采用 0.25% 胰蛋白酶消化后并收集于离心管中，以 5000 r/min 离心 5 min，除去上清液，然后加入 60 μL 裂解液混匀，冰浴 30 min，再以 12 000 r/min 离心 15 min，采用移液枪将上清液转移至离心管中，加入 50 μL 检测缓冲液，10 μL Ac-DEVD-pNA 孵育 12 h，以酶标仪于 405 nm 处测定 A 值，体现 Caspase-3 活性。以添加 PBS（不含药物）作为对照，其余同以上处理。结果见表 10，Tr@TPP/Lip 干预肿瘤细胞后的 Caspase 活性最高，可推测 TPP-PEG-PCL 脂质体将较多的 Tr 递送到线粒体，从而激活 Caspase 家族依赖细胞凋亡通路。

**2.13.7 Western blotting 分析** 将人肝癌细胞 SMMC-772 接种于 6 孔板中（密度约为 1×10<sup>6</sup> 个/mL）置于细胞培养箱中孵育 24 h，待细胞生长到对数期，采用 Tr、Tr@Lip、Tr@TPP/Lip 与人肝癌 SMMC-772 细胞共同孵育，每孔中药物浓度为 80 nmol/L，对照组为含 10% 胎牛血清培养基取代药物。

收集细胞，提取蛋白，以 12% SDS-PAGE 分离胶溶液进行电泳，100 V 湿转 50 min，以 5% 牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）/三(羟甲基)氨基甲烷缓冲盐溶液+聚山梨酯（Triethanolamine buffer saline + Tween, TBST）封闭液室温下封闭 1 h，TBST 洗 10 min，重复 3 次，加入一抗，采用 TBST 按照稀释至适当浓度[B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2

associated X, Bax) 稀释比例均为 1:1000)] 孵育一抗，以 β-actin（稀释比例为 1:1000）作为内参，于 4 °C 振荡过夜，添加辣根过氧化物酶标记的二抗（稀释比例为 1:2000），再采用 TBST 每隔 5 min 清洗，重复 3 次，采用 Image J 图像分析软件进行各组的光密度。以添加 PBS（不含药物）作为对照，其余同以上处理。结果如图 8 所示，Tr@TPP/Lip 可以显著提高促凋亡蛋白 Bax 表达，降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达，与其他 2 组比较，存在显著性差异。根据该结果推测，Tr@TPP/Lip 有助于将大量药物递送到肿瘤线粒体，激活细胞凋亡通路，从而引起凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的改变。

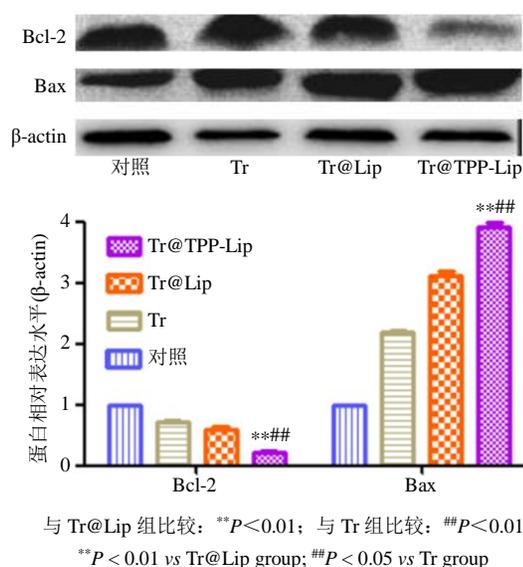


图 8 Tr@TPP/Lip、Tr@Lip 与 Tr 促肝肿瘤细胞凋亡的凋亡相关蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Tr@TPP/Lip, Tr@Lip and Tr promoted expression of apoptosis-related proteins in liver tumor cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3 讨论

肝癌是我国发病率和致死率较高的恶性肿瘤之一，目前临床上主要以手术切除、介入、射频消融等，这些治疗手段最终严重损伤患者的生理机能，5 年生存率仍低于 20%<sup>[19]</sup>。中医药基于“扶正驱邪”理念，不仅关注肿瘤生长抑制，还提高机体的免疫力，目前已成为肿瘤治疗的新方向，目前已成为肿瘤治疗的新方向<sup>[20]</sup>。雷公藤在中医药领域用药历史悠久，如常用的雷公藤片、雷公藤多苷片等。Tr 是该药用植物中提取的活性成分，在抗肿瘤方面相关分子机制较为成熟，以线粒体为中心，提高线粒体膜通透性，引起线粒体生物功能紊乱，从而促进肿瘤细胞凋亡。故构建一种线粒体靶向给药系统，对

于提高该药抗肿瘤效果具有重大研究价值。

本研究采用生物相容性好的脂质体包载 Tr, 并以具有线粒体靶向功能的 TPP 阳离子进行修饰, 成功制备了 Tr@TPP/Lip, 粒径约为(113.5±17.6)nm, Zeta 电位为(12.6±0.7) mV, 透射电镜图片清晰直观的发现 Tr@TPP/Lip 呈现规则圆球形, 粒子大小与马尔文粒径检测结果基本保持一致。稳定性试验结果显示, Tr@TPP/Lip 在 4 °C 放置 60 d 和 37 °C 胎牛血清孵育过程中, 纳米粒子均能保持较好的粒子形态, 载药量和包封率也基本与最初差不多, 由此表明 Tr@TPP/Lip 具有较好的稳定性。从 Tr@TPP/Lip 制备的材料分析, 大豆磷脂属于天然磷脂, 可自发形成良好的磷脂双分子层, 胆固醇还可以加强脂质体的流动性, TPP-PEG-PCL 属于双亲性高分子材料, 恰好嵌合在磷脂双分子层的亲水和亲脂层中, 借助于高分子链状结构加强脂质体的稳定性; 磷脂双分子层具有较强的电负性, 能中和正电荷 TPP 阳离子, 很大程度上减少 TPP 阳离子吸附电负性物质, 加强脂质体的稳定性。另外, TPP 阳离子具有较强的正电性, 采用 TPP-PEG-PCL 修饰脂质体后, TPP 阳离子链接的 PEG 镶嵌在磷脂双分子层亲水层, PCL 属于亲脂性材料则与脂质体的疏水层能较好的融合, 而 TPP 阳离子类似靶标穿插于脂质体亲水层表面, 故 Tr@TPP/Lip 仍可保持正电势, 与文献报道的一样具有较强的靶向性<sup>[17]</sup>。红细胞溶血结果显示, Tr@TPP/Lip 的溶血率基本 5% 以下, 具有很好的血液相容性, 可能是脂质体具有较好的生物相容性, 包载药物后能掩盖药物的免疫原性, 减少药物与红细胞的直接接触; 体外释放结果表明, Tr@TPP/Lip 释药缓慢, 有助于延长药物的体内循环时间, 将更多的药物输送到效应部位; 细胞荧光试验结果表明, TPP 阳离子可促进 TPP-PEG-PCL 脂质体与肿瘤细胞的融合, 还能有助于脂质体的跨膜转运, 突破线粒体膜的阻碍, 靶向聚集在线粒体周围, 从而实现了药物的线粒体靶向传输。目前大量文献表明, 鉴于细胞膜和线粒体膜均带负电荷, 故可吸引到正电荷的 TPP 阳离子, 提高纳米粒子靶向线粒体的能力达 100~150 倍, 很大程度上克服高黏度细胞液的阻碍, 促进药物进入线粒体的效率, 从而增强药物的抗肿瘤效果<sup>[21-22]</sup>。小动物活体成像结果显示, TPP 阳离子能明显提高脂质体的肝靶性效果, 有助于将大部分药物聚集在肝细胞部位, 且具有良好的滞留效应, 可能的原因是带正电荷的

Tr@TPP/Lip 被带负电荷的肝细胞膜所吸引, 增强了药物载体在肝脏部位的滞留。细胞药效结果表明, Tr@TPP/Lip 促肝肿瘤细胞凋亡的 IC<sub>50</sub> 浓度最小, 等浓度下肿瘤细胞凋亡率最高, 明显优于 Tr 普通脂质体和 Tr, 存在显著性差异; 另外, Tr@TPP/Lip 还可以显著升高细胞内 ROS 水平和 Caspase-3 活性, 降低线粒体膜 Zeta 电位, 提高促凋亡蛋白 Bax 表达, 明显降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 据此推测, TPP-PEG-PCL 脂质体能促进药物的跨膜转运, 并靶向肿瘤线粒体部位, 故能很大程度上提高药物促肝肿瘤细胞凋亡效果。尽管如此, 文献报告 TPP 阳离子修饰的靶向给药系统在体内代谢过程中, 容易被带负电荷的血浆蛋白吸附的问题, 从而影响药物的靶向行为<sup>[23]</sup>。

本实验成功制备了 Tr@TPP/Lip, 稳定性较好, 具有良好的肝癌细胞线粒体靶向性, 能明显增强药物促肝癌细胞凋亡效果。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 陈建国. 中国肝癌发病趋势和一级预防 [J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(4): 256-260.
- [2] 张杨, 游阿彬, 齐寒, 等. 负载化疗药物的外泌体对肝癌的靶向治疗研究 [J]. 天津医科大学学报, 2021, 27(3): 229-233.
- [3] 于杉. 原发性肝癌化疗栓塞风险的多因素分析 [J]. 中国医药指南, 2020, 18(12): 167-168.
- [4] 曹建, 朱晓燃, 杨振寰, 等. 基于网络药理学探讨清肝化瘀颗粒治疗肝癌的作用机制 [J]. 中草药, 2021, 52(7): 2039-2052.
- [5] 宋娜, 吴施国, 谢星星, 等. 中药干预肝癌及其疼痛的分子机制研究进展 [J]. 现代中医药, 2021, 41(4): 1-6.
- [6] 宋基正, 刘宇灵, 林龙飞, 等. 雷公藤甲素抗肿瘤新型给药系统研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1269-1275.
- [7] 黄宇, 马全鑫, 凌云. 雷公藤甲素抗肿瘤药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(2): 328-333.
- [8] You L, Dong X, Ni B, et al. Triptolide induces apoptosis through fas death and mitochondrial pathways in HepaRG cell line [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 813.
- [9] Liu X, Zhao P, Wang X, et al. Triptolide induces glioma cell autophagy and apoptosis via upregulating the ROS/JNK and downregulating the Akt/mTOR signaling pathways [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 387.
- [10] 宋慧娜. 线粒体靶向的雷公藤甲素衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2020.

- [11] 王晓菲. 雷公藤甲素通过线粒体途径促进子宫内癌膜细胞凋亡的实验研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2013.
- [12] 刘斌, 樊丹平, 舒海洋, 等. 雷公藤甲素毒性作用及减毒研究的整合探析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(20): 181-190.
- [13] 冯宇飞, 常书源, 秦国昭, 等. 星点设计-效应面法优化 pH 值响应及线粒体靶向双功能金丝桃苷脂质体的处方及其体外评价 [J]. 中草药, 2020, 51(23): 5934-5942.
- [14] Shao J, Li M, Guo Z, *et al.* TPP-related mitochondrial targeting copper (II) complex induces p53-dependent apoptosis in hepatoma cells through ROS-mediated activation of Drp1 [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 149.
- [15] Biswas S, Dodwadkar N S, Deshpande P P, *et al.* Liposomes loaded with paclitaxel and modified with novel triphenylphosphonium-PEG-PE conjugate possess low toxicity, target mitochondria and demonstrate enhanced antitumor effects *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2012, 159(3): 393-402.
- [16] 韩黎丽, 吕慧芳, 王丹, 等. 具有线粒体靶向功能的载去甲斑蝥素 TPP-PEG-PCL 纳米胶束促肝肿瘤细胞凋亡研究 [J]. 中草药, 2020, 51(19): 4943-4953.
- [17] 钱勇, 费文静, 诸晨, 等. 高效液相色谱法测定雷公藤滴丸中雷公藤甲素的含量 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11): 4115-4116.
- [18] Al-Amin M D, Mastrotto F, Garofalo M, *et al.* Dexamethasone loaded liposomes by thin-film hydration and microfluidic procedures: Formulation challenges [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1611.
- [19] 于泳. Regulome-SNP 与原发性肝癌生存率的相关研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2020.
- [20] 王蜀梅. 扶正祛邪方在晚期胃癌治疗中的应用 [J]. 中国民间疗法, 2016, 24(9): 42-43.
- [21] Murphy M P. Targeting lipophilic cations to mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*, 2008, 1777(7/8): 1028-1031.
- [22] Biswas S, Dodwadkar N S, Piroyan A, *et al.* Surface conjugation of triphenylphosphonium to target poly(amidoamine) dendrimers to mitochondria [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(18): 4773-4782.
- [23] Zhou W, Yu H, Zhang L J, *et al.* Redox-triggered activation of nanocarriers for mitochondria-targeting cancer chemotherapy [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(43): 17044-17053.

[责任编辑 郑礼胜]