

• 药剂与工艺 •

甘草酸替代胆固醇构建载雷公藤甲素的脂质纳米粒的适宜性研究

徐资怡, 陈佳美, 钟雪梅, 吴亿晗*, 章津铭*

成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137

摘要: 目的 鉴于胆固醇潜在的健康危害, 探索利用甘草酸替代胆固醇, 制备用以替代胆固醇脂质纳米粒 (cholesterol lipid nanoparticles, CLN) 的甘草酸脂质纳米粒 (glycyrrhizic acid lipid nanoparticles, GLN), 通过包载抗肿瘤药物雷公藤甲素 (triptolide, Tr) 制备载雷公藤甲素的甘草酸脂质纳米粒 (GLN loaded with triptolide, Tr@GLN), 探讨甘草酸替代胆固醇制备抗肿瘤纳米载体的适宜性。方法 采用乙醇注入法分别制备 Tr@GLN 和载雷公藤甲素的胆固醇脂质纳米粒 (CLN loaded with triptolide, Tr@CLN), 分别测定两者粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位、药物包封率和载药量; 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 拍摄其形态; 共聚焦显微镜拍摄人肝癌 HepG2 细胞对两者摄取情况; 建立皮下荷瘤肝癌小鼠模型, 对比研究 Tr@GLN 与 Tr@CLN 的体内抗肿瘤效果。结果 与 Tr@CLN 相比, Tr@GLN 在粒径、PDI、 ζ 电位、包封率和载药量等理化性质均无显著性差异。Tr@GLN 和 Tr@CLN 的平均粒径分别为 (115.59 ± 1.23) 、 (97.28 ± 0.95) nm; ζ 电位分别为 (-19.63 ± 3.14) 、 (-7.77 ± 0.12) mV; Tr 包封率分别为 $(89.70 \pm 0.39)\%$ 、 $(87.39 \pm 0.37)\%$; Tr 载药量分别为 $(2.25 \pm 0.01)\%$ 、 $(2.31 \pm 0.01)\%$; 甘草酸包封率为 $(87.46 \pm 0.65)\%$; 甘草酸载药量为 $(13.41 \pm 0.09)\%$ 。TEM 观察到, 相比 Tr@CLN, Tr@GLN 呈更加均匀圆整的球状。GLN 增加了 HepG2 细胞对药物的摄取。给药 12 d 后, Tr@GLN 对荷瘤小鼠肿瘤体积抑制率达到 78.9%, 显著高于 Tr@CLN 组抑制率 (42.4%) 和 Tr 组抑制率 (18.3%) ($P < 0.05$), Tr@GLN 治疗后肿瘤中重组 Ki-67 蛋白 (recombinant Ki-67 protein, Ki-67) 表达减少, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达减少, 并将肿瘤相关的巨噬细胞从肿瘤 M2 表型重新诱导为 M1 表型。结论 制备的 Tr@GLN 与 Tr@CLN 具有相似理化性质, 但 GLN 包载更有利于增加肿瘤细胞的摄取, Tr@GLN 表现出更强的抗肿瘤作用, 其抗肿瘤作用可能与抑制肿瘤细胞分化、减少肿瘤新血管生成、促进肿瘤相关巨噬细胞的极化调节相关, 说明所构建的 GLN 适宜于作为纳米载体, 为抗肿瘤药物的高效传递提供新思路。

关键词: 甘草酸; 雷公藤甲素; 胆固醇; 脂质体; 抗肿瘤; 肿瘤免疫

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)03-0722-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.006

Study on suitability to construct lipid nanoparticles loaded with triptolide using glycyrrhizic acid as alternative of cholesterol

XU Zi-yi, CHEN Jia-mei, ZHONG Xue-mei, WU Yi-han, ZHANG Jin-ming

Key Laboratory of Standardization of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, State Key Laboratory of Southwest Specialty Chinese Medicine Resources, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective In view of the potential health hazards of cholesterol, glycyrrhizic acid was explored to replace cholesterol to prepare glycyrrhizic acid lipid nanoparticles (GLN) for replacing cholesterol lipid nanoparticles (CLN). GLN loaded with triptolide (Tr@GLN) were prepared by encapsulating the anti-tumor drug triptolide (Tr), to explore the suitability of glycyrrhizic acid replacing cholesterol in the preparation of anti-tumor nanocarriers. **Methods** Tr@GLN and CLN loaded with triptolide (Tr@CLN) were prepared by ethanol injection method, and the particle size, PDI, ζ potential, drug entrapment efficiency and drug loading efficiency of

收稿日期: 2022-07-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973662); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目 (ZYXCXTD-D-202209)

作者简介: 徐资怡 (1998—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药新制剂研究与开发。Tel: 15680619032 E-mail: 982916034@qq.com

*通信作者: 章津铭, 教授, 主要从事中药新剂型与新制剂研究。Tel: 13551043885 E-mail: cdutcmzjm@126.com

吴亿晗, 博士, 主要从事中药新剂型与新制剂研究。Tel: 15680803903 E-mail: yihanwuone@126.com

Tr@GLN and Tr@CLN were measured respectively. The morphology of Tr@GLN and Tr@CLN was photographed by transmission electron microscope (TEM). The cell uptake of the both in HepG2 hepatocellular carcinoma cells was measured by confocal microscopy. The subcutaneous tumor-bearing liver cancer mouse model was established, and the *in vivo* antitumor effects of Tr@GLN and Tr@CLN were compared. **Results** Compared with Tr@CLN, the physicochemical properties of Tr@GLN, such as particle size, PDI, ζ potential, entrapment efficiency and drug loading efficiency, were not significantly different. The particle sizes of Tr@GLN and Tr@CLN were (115.59 ± 1.23) , (97.28 ± 0.95) nm; ζ Potential were (-19.63 ± 3.14) , (-7.77 ± 0.12) mV; The entrapment efficiency of Tr were $(89.70 \pm 0.39)\%$, $(87.39 \pm 0.37)\%$; The drug loading efficiency of Tr were $(2.25 \pm 0.01)\%$, $(2.31 \pm 0.01)\%$; The entrapment efficiency of GL was $(87.46 \pm 0.65)\%$; The drug loading efficiency of GL was $(13.41 \pm 0.09)\%$. Compared with Tr@CLN, Tr@GLN showed a more uniform spherical shape by TEM. GLN increased drug uptake by HepG2 hepatoma cells. After 12 d of administration, the tumor volume inhibition rate of Tr@GLN on tumor-bearing mice reached 78.9%, which was significantly higher than that of Tr@CLN group (42.4%) and Tr group (18.3%) ($P < 0.05$). The expression of recombinant Ki-67 protein (Ki-67) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumors decreased after Tr@GLN treatment, and tumor-associated macrophages were reinduced from the tumor M2 phenotype to the M1 phenotype. **Conclusion** The Tr@GLN prepared in this study has similar physicochemical properties to Tr@CLN, and the encapsulation of GLN is more beneficial to increase the uptake of tumor cells. Tr@GLN showed stronger anti-tumor effect, and its anti-tumor effect may be related to inhibiting tumor cell differentiation, reducing tumor neo-vascularization, and promoting the polarization adjustment of tumor-associated macrophages, indicating that the constructed GLN is suitable as a nanocarrier, and provides a new idea for the efficient delivery of anti-tumor drugs.

Key words: glycyrrhizic acid; triptolide; cholesterol; liposome; anti-tumor; tumor immunity

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. 中提取出的环氧二萜内酯化合物, 具有广谱、高效的抗肿瘤作用, 其抗肿瘤作用机制包括诱导细胞凋亡、干扰细胞周期、抑制血管生成、抑制端粒酶活性、诱导肿瘤细胞自噬等^[1-2]。尤其对于在我国具有高发病率和高死亡率的肝癌, Tr 具有显著疗效, 其抗肝癌活性在细胞模型和动物模型上甚至强于阿霉素、索拉非尼等临床一线药物, 是目前极具潜力的候选药物^[3-4]。然而, Tr 水溶性差、治疗窗窄, 对肿瘤组织/细胞分布缺乏专属性, 容易造成对肝肾组织、血液系统的毒副作用^[5-7]。

纳米载体具有较强的载药能力、体内长循环、肿瘤组织被动/主动靶向、减少药物不良反应等优势^[8]。课题组前期构建了多种纳米载体用于 Tr 抗肿瘤的高效递送^[9-11]。脂质体是目前应用最成熟和广泛的抗肿瘤药物递送载体, 胆固醇是其重要组成部分, 具有维持脂质体磷脂双分子层膜稳定性的作用, 但胆固醇易受氧、光、金属等外界条件的影响, 在加工储存过程中产生胆固醇氧化产物, 具有一定的细胞毒性、致突变性和潜在致癌性^[12-14]; 此外, 摄入过量胆固醇可能引起高脂血症、动脉粥样硬化等疾病^[15-16]。高胆固醇水平与肿瘤发生发展也有相关性, 胆固醇还可能诱发“补体介导的假过敏反应”, 导致肺动脉高压等心肺副作用^[17-18]。

筛选与胆固醇结构相似, 用以构建不含胆固醇

的脂质纳米体系是目前研究热点之一, 具有良好的研究和应用前景。植物中的甾醇和皂苷, 如类胡萝卜素、大豆甾醇、人参皂苷等, 已被证明具有类似于胆固醇的类固醇结构、热致相行为和抗脂质体氧化的作用, 将其替代胆固醇构建脂质纳米载体, 可以有效改善含胆固醇的磷脂双层理化性质^[19]。研究者发现, 部分中药三萜皂苷成分与胆固醇结构相似, 且具有良好药理活性, 用以替换胆固醇, 既能保持脂质体载药性能, 又赋予脂质体新的药效或靶向性能, 体现出“药辅合一”的特点^[14]。复旦大学王建新教授团队^[18]将人参皂苷 Rh₂ 代替胆固醇作为脂质体关键膜材, 制备递送紫杉醇的脂质纳米粒, 药辅两用, 利用人参皂苷 Rh₂ 与葡萄糖转运体结合提高纳米粒肿瘤靶向性, 而且发挥其自身抗肿瘤和免疫调节作用, 从而赋予纳米载体高稳定性、长循环、主动靶向和免疫调节等多种功能。

甘草酸是豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的主要活性成分之一, 属于齐墩果烷型五环三萜皂苷, 具有较好的抗肿瘤活性^[20]。甘草酸具有两亲性类似于表面活性剂的结构特点^[21], 可与细胞膜上的胆固醇或磷脂相互作用, 改变脂质流动性, 增加细胞膜通透性和药物跨膜能力^[22-23]。此外, 研究证实肝癌细胞表面存在大量甘草酸特异性结合位点^[24-25], 经甘草酸修饰的纳米载体具有更强的肝癌靶向能力。

因此, 本实验拟采用甘草酸替代胆固醇作为脂

质膜材, 将其用于 Tr 的包载和抗肿瘤递送, 制备一种新型载雷公藤甲素的甘草酸脂质纳米粒 (glycyrrhizic acid lipid nanoparticles loaded with triptolide, Tr@GLN)。通过对比考察 Tr@GLN 与胆固醇为膜材的载雷公藤甲素脂质体 (cholesterol lipid nanoparticles loaded with triptolide, Tr@CLN) 的理化性质、载药性能、体外细胞摄取能力、荷瘤肝癌小鼠模型抗肿瘤作用等方面, 从而揭示甘草酸替代胆固醇构建脂质纳米粒并作为 Tr 递药载体的适宜性, 为其抗肿瘤递送提供了新思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UltiMate 3000 型高效液相色谱 (HPLC) 仪, 美国 Thermo Fisher 公司; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器, 上海邦西仪器科技有限公司; Litesizer 500 纳米粒度及 ζ 电位分析仪, 上海安东帕商贸有限公司; YMN-1000Y 超声波细胞粉碎机, 南京以马利仪器设备有限公司; JEM-1230 透射电子显微镜, 日本 JEOL 公司; TSC SP8 STED 激光扫描共聚焦显微镜, 德国 Leica 公司。

1.2 药品与试剂

Tr, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 DSTDL003401, 成都德思特生物技术有限公司; 甘草酸, 质量分数 $> 98\%$, 批号 D1213A, 天津美伦医药有限公司; 蛋黄卵磷脂, 批号 AL20002, 上海艾伟拓医药科技有限公司; 胆固醇, 批号 C104028, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; DMEM 培养液、0.25% 胰蛋白酶、青-链霉素溶液, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS), 杭州四季青公司; 激光共聚焦皿, 北京硕华佰奥生物科技有限公司; 乙腈, 色谱纯, 上海西格玛奥德里奇贸易有限公司; 磷酸, 色谱纯, 成都市诺尔施科技有限责任公司; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞株及实验动物

人肝癌 HepG2 细胞、小鼠肝癌 H22 细胞均购自中科院上海细胞生物研究所。ICR (institute of cancer research) 小鼠, SPF 级, 体质量 20~25 g, 雄性, 购于北京斯贝福生物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2019-0010。饲养条件: 温度为 20~26 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 40%~70%。实验期间动物自由进食、饮水, 昼夜节律正常。动物实验获得成都中医药大学动物实验伦理委员会的批准, 批准号 2020DL-126。

2 方法与结果

2.1 Tr@GLN 和 Tr@CLN 的制备

采用乙醇注入法分别制备 Tr@GLN、Tr@CLN^[26-29]。称取 6 mg 甘草酸或胆固醇、30 mg 蛋黄卵磷脂以及 1 mg Tr 完全溶解于 2 mL 乙醇中, 作为有机相。将有机相缓慢匀速滴入 10 mL 水相 (纯水) 中, 边滴加边搅拌, 滴加完毕后于在磁力搅拌器上 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 400 r/min 搅拌 1 h。待有机溶剂挥尽后, 用超声波细胞破碎仪冰浴探超 5 min, 超声破碎 3 s, 间歇 2 s。最后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得到白色乳光的 Tr@GLN 和 Tr@CLN 溶液。

2.2 Tr@GLN 和 Tr@CLN 的表征

2.2.1 粒径、多分散指数 (polydispersity, PDI) 与 ζ 电位考察 分别取一定体积的样品溶液于粒径池和电位池中, 利用纳米粒度及 ζ 电位分析仪测定其粒径、PDI 及 ζ 电位值。结果显示, 采用乙醇注入法制备得到 Tr@GLN 和 Tr@CLN 均为带乳白色乳光的透明液体, 如图 1-IA、IIA 所示; 其粒径相差不大, 分别为 (115.59 ± 1.23) 、 (97.28 ± 0.95) nm, PDI 分别为 0.18 ± 0.03 、 0.22 ± 0.02 , 均小于 0.3, 制备的 Tr@GLN 粒径均匀度、分散性较好, 见图 1-IB、IIB。 ζ 电位分别为 (-19.63 ± 3.14) 、 (-7.77 ± 0.12) mV, 表明 Tr@GLN 各微粒之间带有一定程度的负电性, 这对脂质纳米粒的相互聚集有一定的抑制作用, 有助于增强脂质体体系的稳定性。

2.2.2 形态学考察 取 10 μL 样品溶液于碳膜铜网上, 静置 1 min 后将多余液体从铜网边缘除去。再将 3% 磷钨酸水溶液滴加 1 滴至铜网表面, 负染 2 min 后用滤纸吸附多余染料, 待液体挥干后在 TEM 下拍摄其形态, 结果见图 1-IC、IIC。通过 TEM 拍摄显示, Tr@CLN 呈类椭圆形的多层结构; 相比 Tr@CLN, Tr@GLN 的形貌呈更加均匀圆整球形, 具有多层结构, 分散性适中。

2.2.3 储存稳定性考察 将 Tr@CLN、Tr@GLN 密封放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 连续 7 d 测量其粒径、 ζ 电位值变化, 结果如表 1 所示, 两者粒径在低温储存条件下具有稳定的粒径和 ζ 电位, 表明甘草酸代替胆固醇后可以得到稳定的脂质体。

2.3 Tr@GLN 和 Tr@CLN 的包封率及载药量测定

2.3.1 HPLC 色谱条件

(1) TP 测定条件^[11]: 色谱柱为 Welch Ultimate XB-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为纯水-甲醇 (54:46); 检测波长 220 nm; 体积流量

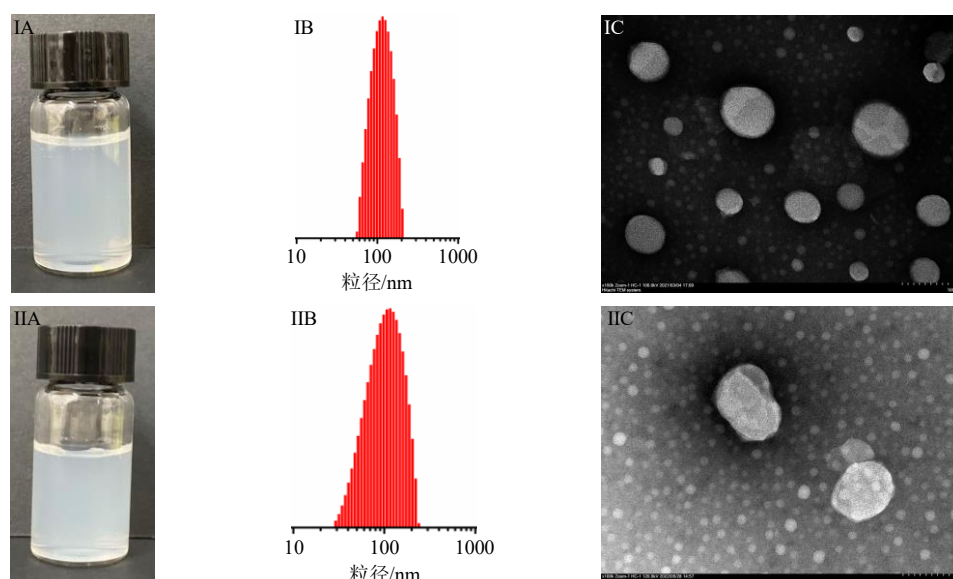


图 1 Tr@GLN (I) 和 Tr@CLN (II) 的外观 (A)、粒径分布 (B)、TEM 形态 (C, 比例尺为 100 nm)

Fig. 1 Appearance (A), particle size distribution (B), TEM morphology (C, scale bar is 100 nm) of Tr@GLN (I) and Tr@CLN (II)

表 1 Tr@GLN 和 Tr@CLN 的存储稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Storage stability of Tr@GLN and Tr@CLN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

存储 时间/d	Tr@GLN		Tr@CLN	
	粒径/nm	ζ 电位/mV	粒径/nm	ζ 电位/mV
1	115.59±1.23	-19.63±3.14	97.28±0.95	-7.77±0.12
2	117.91±0.17	-26.30±0.67	95.34±0.56	-6.00±0.79
3	114.44±1.44	-26.87±0.17	96.81±1.51	-8.43±0.17
4	113.18±0.36	-23.47±0.38	101.07±1.80	-7.63±0.42
5	115.73±2.52	-26.93±0.52	100.48±0.80	-10.53±0.48
6	113.73±3.90	-26.60±0.67	96.90±0.24	-6.80±0.22
7	115.22±1.01	-23.63±1.61	95.11±0.60	-7.40±0.88

1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。

(2) 甘草酸测定条件^[30]: 色谱柱为 Welch Ultimate XB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1%磷酸水溶液-甲醇 (25:75); 检测波长 250 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。

2.3.2 供试品溶液和对照品溶液的制备 取 2 mL 甲醇于 1 mL Tr@CLN 或 Tr@GLN 溶液中, 涡旋、超声破乳, 使得制备的脂质体完全破坏, 过 0.22 μm 有机滤膜, 即得供试品溶液。

分别精密称取 Tr 对照品、甘草酸对照品于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶液定容, 得到 1 mg/mL Tr 对照品母液和 2.06 mg/mL 甘草酸对照品母液。

2.3.3 专属性考察 取“2.3.2”项供试品溶液和对

照品溶液, 分别按照“2.3.1”项下色谱条件进样。结果如图 2、3 所示, 可知 Tr 和甘草酸的保留时间分别为 10.77、8.53 min, 供试品溶液和对照品溶液出峰时间相同, 供试品溶液中的溶剂和辅料对 Tr 和甘草酸的测定无干扰。

2.3.4 线性关系考察 分别取“2.3.2”项 Tr、甘草

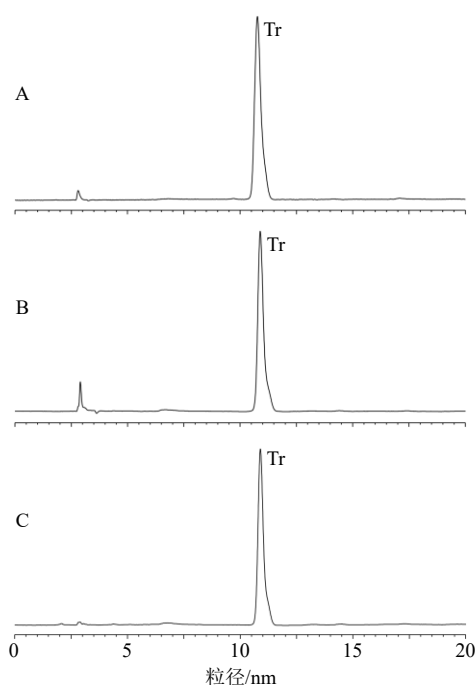


图 2 Tr 对照品 (A)、Tr@GLN 样品 (B) 和 Tr@CLN 样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC of triptolide reference substance (A), Tr@GLN sample (B) and Tr@CLN sample (C)

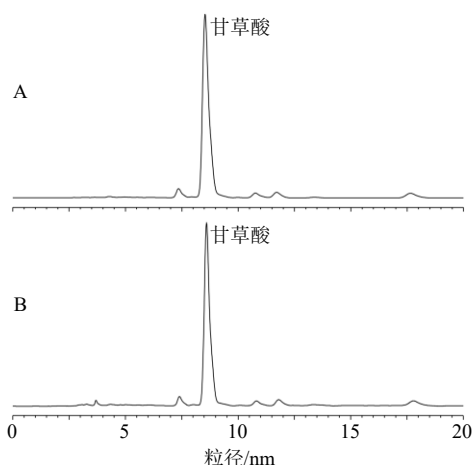


图3 甘草酸对照品 (A) 和 Tr@GLN 样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 3 HPLC of glycyrrhizic acid reference substance (A) and Tr@GLN sample (B)

酸对照品溶液, 用甲醇分别稀释成 500、250、125、62.5、31.25、15.625 $\mu\text{g/mL}$ Tr 对照品溶液和 1 030、515、257.5、128.75、64.375、32.187 5 $\mu\text{g/mL}$ 甘草酸对照品溶液, 过 0.22 μm 滤膜, 进样。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到标准曲线回归方程分别为 Tr $Y=17\,537\,X+134\,487$, $r=0.999\,0$, 线性范围 500~15.625 $\mu\text{g/mL}$; 甘草酸 $Y=5\,822.6\,X+79\,001$, $r=0.999\,0$, 线性范围 1 030~32.187 5 $\mu\text{g/mL}$, 表明在定量范围内各质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.3.5 精密度试验 取“2.3.2”项下 Tr@GLN 和 Tr@CLN 供试品溶液, 分别连续进样 6 次, 计算 Tr@GLN 样品中的 Tr 和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.51%、0.58%, Tr@CLN 样品中的 Tr 和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.48%、0.63%, 说明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取“2.3.2”项下 Tr@GLN 和 Tr@CLN 供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 计算 Tr@GLN 样品中的 Tr 和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.23%、0.41%, Tr@CLN 样品中的 Tr 和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.59%、0.62%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 按照“2.3.2”项方法配制 Tr@GLN 和 Tr@CLN 供试品溶液, 平行 6 份, 进样, 计算 Tr@GLN 样品中的 Tr 和甘草酸质量浓度的 RSD 分别为 1.28%、1.07%, Tr@CLN 样品中的 Tr 和甘草酸质量浓度的 RSD 分别为 1.23%、1.04%, 说明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 取 6 份已测定 Tr 和甘草

酸含量的 Tr@GLN 溶液各 500 μL , 分别加入 Tr 对照品溶液 (1 mg/mL) 500 μL , 甘草酸对照品溶液 (2.06 mg/mL) 500 μL , 随后涡旋、超声处理, 过 0.22 μm 微孔滤膜。平行 6 份, 进样, 计算 Tr 和甘草酸的平均加样回收率分别为 100.07%、99.43%, RSD 分别为 1.84%、1.50%, 表明该方法回收率良好。

另取 6 份已测定 Tr 含量的 Tr@CLN 溶液各 500 μL , 分别加入 Tr 对照品溶液 (1 mg/mL) 500 μL , 随后涡旋、超声处理, 过 0.22 μm 微孔滤膜。平行 6 份, 进样, 计算得 Tr 的平均加样回收率为 99.48%, RSD 为 1.83%, 表明该方法回收率良好。

2.3.9 包封率和载药量的测定 取 2 mL 甲醇分别于 1 mL Tr@GLN 和 Tr@CLN 样品溶液中, 涡旋、超声破乳, 使得制备的脂质体完全破坏, 过 0.22 μm 有机滤膜, 用高效液相测定样品中甘草酸与 Tr 含量, 根据公式分别计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = W_0 / W_1$$

$$\text{载药量} = W_0 / (W_1 + W_2)$$

W_0 为脂质纳米粒或脂质体中药物含量, W_1 为药物投加量, W_2 为脂质纳米粒或脂质体材料量

计算得到 Tr@GLN 和 Tr@CLN 中 Tr 的包封率分别为 (89.70 $\pm$ 0.39)%、(87.39 $\pm$ 0.37)%, 载药量分别为 (2.25 $\pm$ 0.01)%、(2.31 $\pm$ 0.01)%; Tr@GLN 中的甘草酸包封率为 (87.46 $\pm$ 0.65)%, 载药量为 (13.41 $\pm$ 0.09)%。

2.4 Tr@GLN 和 Tr@CLN 的体外释放行为考察

分别将 3 mL Tr@CLN、Tr@GLN 溶液置于透析袋 (截留相对分子质量 3500) 中, 将透析袋浸入到 30 mL 含有 0.1% 聚山梨酯 80 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中, 放入摇床, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 条件下振摇。分别于 0.5、1、2、3、4、6、8、12、24 h 取 1 mL 释放介质, 并补充相同体积的新鲜释放介质。加入 2 mL 甲醇到所取释放介质中, 涡旋、超声破乳后, 过 0.22 μm 有机滤膜, 采用 HPLC 测得 Tr 含量, 并计算累积释放率。结果如图 4 所示, Tr@GLN 和 Tr@CLN 都在 8 h 内达到饱和, 累积释放率分别为 52.92%、73.38%。Tr@GLN 中 Tr 在 24 h 内释放较 Tr@CLN 缓慢, 说明甘草酸作为膜材料替代胆固醇可以使脂质体更加稳定, 具有一定缓释作用。

2.5 Tr@GLN 和 Tr@CLN 在 HepG2 细胞摄取能力考察

考虑到 Tr 无荧光, 本研究采用带绿色荧光的香豆素 6 (coumarin 6, C6) 作为表征药物, 按照“2.1”

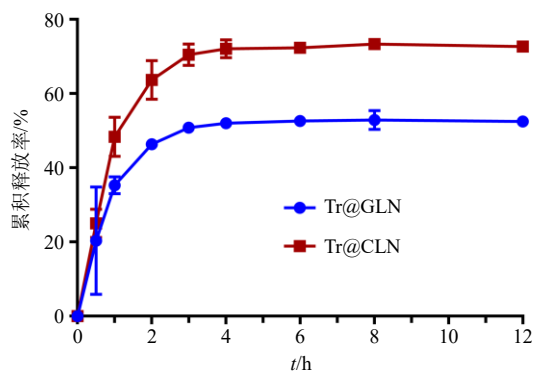


图 4 Tr@CLN 和 Tr@GLN 的体外释药情况

Fig. 4 In vitro release of Tr@CLN and Tr@GLN

项方法制备得到 C6@CLN、C6@GLN。将 HepG2 细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种到激光共聚焦培养皿中并培养过夜。待细胞贴壁后，将培养基分别更换为含有等量 C6 质量浓度 (100 ng/mL) 的游离 C6、C6@CLN、C6@GLN 的低血清新鲜培养基。于 37 °C 培养箱孵育 4 h 后，弃去培养基，用冷 PBS 洗涤 2 次。加入 4% 多聚甲醛固定 15 min，用冷 PBS 洗涤 2 次，再加入 Hoechst 33342 染细胞核 10 min，用 PBS 清洗后加入 1 滴防荧光猝灭剂，采用激光共聚焦显微镜观察 HepG2 细胞对 C6@GLN 的摄取情况。结果如图 5 所示，C6 呈绿色荧光，C6/GLLNP

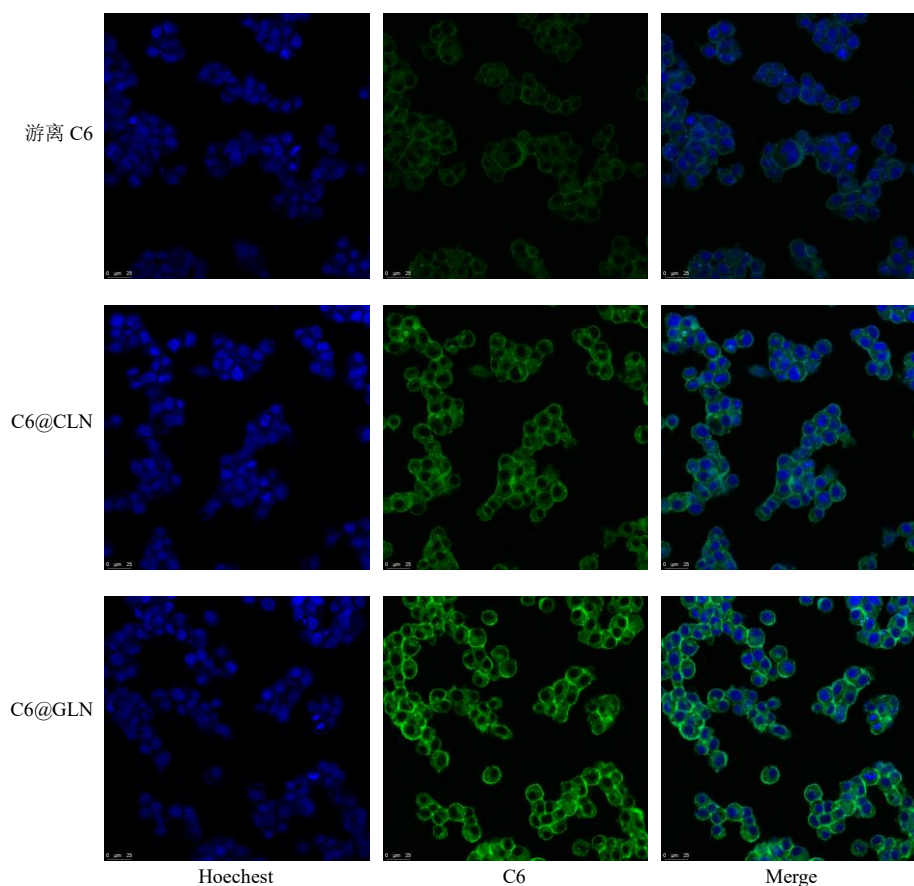


图 5 游离荧光探针 C6、C6@CLN、C6@GLN (C6 质量浓度均为 100 ng·mL⁻¹) 孵育 4 h 后 HepG2 细胞摄取情况 (蓝色荧光为细胞核染色，绿色荧光为摄取进细胞的 C6，比例尺为 25 μm)

Fig. 5 Uptake of HepG2 cells with free fluorescent probes C6, C6@CLN and C6@GLN (mass concentration of C6 was 100 ng·mL⁻¹) after incubation for 4 h (blue fluorescence is nuclear staining, green fluorescence is C6 absorbed into cells, scale bar is 25 μm)

的荧光强度显著高于游离 C6 和 C6@CLN，表明 GLN 可以增加 HepG2 细胞对游离药物的摄取，并且 HepG2 细胞对其摄取优于 C6@CLN，这可能与肝癌细胞膜表面具有甘草酸受体相关^[31]。

2.6 Tr@GLN 和 Tr@CLN 的体内抗肿瘤活性研究

取对数生长期的 H22 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消

化后离心，用 PBS 洗涤 2 次并重悬后调整其密度为 1×10^7 个/mL，取 100 μL 于小鼠皮下接种。当肿瘤体积达到 100 mm³ 左右时，将小鼠随机分为 6 组，分别给予生理盐水 (对照)、Tr@GLN、Tr@CLN、游离 Tr、游离甘草酸、游离 Tr+游离甘草酸，其中 Tr 给药剂量为 0.35 mg/kg，甘草酸给药剂量为 2.38

mg/kg。每 2 天给药 1 次，给药当天测量体质量和肿瘤体积，第 12 天处死小鼠^[10,32]。使用游标卡尺测量肿瘤体积，分别按公式计算肿瘤体积以及抑制率。

$$V_t = D^2 L / 2$$

$$\text{抑制率} = (W_c - W_t) / W_c$$

L 为肿瘤最长直径， D 为肿瘤最短直径， V_t 为肿瘤体积， W_c 和 W_t 分别代表对照组和各治疗组的肿瘤质量

采用 t 检验分析比较各组数据， $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

表 2 治疗期间各组皮下荷瘤肝癌小鼠肿瘤体积变化

Table 2 Changes in tumor volume of subcutaneous hepatocellular carcinoma mice in each group during treatment

组别	肿瘤体积/mm ³						
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d
对照	96.03±30.56	132.46±23.24	188.98±53.86	264.26±63.41	693.02±225.57	1 019.08±480.42	1 327.92±413.33
游离 Tr	148.87±24.54	209.47±54.38	300.35±80.43	332.55±189.68	539.61±187.04	732.58±332.79	1 081.27±508.05
游离甘草酸	174.20±48.83	171.29±106.95	165.62±47.63	161.46±78.78	276.70±98.08	501.08±124.52	656.84±206.97
游离 Tr+游离甘草酸	100.51±28.99	119.26±21.59	165.05±80.43	180.17±66.13	427.78±241.29	573.52±177.30	731.46±189.03
Tr@CLN	86.70±43.33	137.21±47.78	149.73±69.18	245.06±127.84	371.60±85.08	699.17±124.69	775.48±174.29
Tr@GLN	83.83±55.99	73.23±21.70	111.61±31.70	86.88±23.98	188.44±47.14	250.74±81.23	393.80±99.19**

与对照组比较：# $P < 0.05$ ；与游离 Tr 组比较：* $P < 0.05$

$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs free Tr group

Tr@GLN 组对肿瘤生长的抑制作用显著强于游离 Tr 组 ($P < 0.05$)，进一步证明所制备得到的 Tr@GLN 由于渗透滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 以及主动靶向性使得其抗肿瘤作用明显优于游离 Tr。此外，Tr@GLN 组与对照组相比，对肿瘤生长有显著抑制效果 ($P < 0.05$)，抑瘤率为 78.9%，高于 Tr@CLN 组 (抑瘤率为 42.4%)，这可能是由于 GLN 本身具有调节肿瘤相关巨噬细胞极化作用，将 Tr 包载于 GLN 中，使得 Tr 与甘草酸共达肿瘤部位对抗肿瘤。

实验结束后，小鼠肿瘤拍照结果和肿瘤质量同样表明，Tr@GLN 具有最佳抗肿瘤效果 (图 6 和表 3)。在整个治疗期间，各组小鼠体质量均有相应增加，表明在 Tr 安全给药剂量下，Tr@GLN 并未表现出毒性，在体内安全性良好 (表 4)。

2.7 Tr@GLN 和 Tr@CLN 的体内抗肿瘤机制研究

为了进一步证实组织学水平的抗肿瘤作用，在第 12 天治疗结束后，将所有小鼠处死，切取肿瘤组织进行苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE 染色)、重组 Ki-67 蛋白 (recombinant Ki-67 protein, Ki-67, 肿瘤细胞增殖标志物) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF,

结果如表 2 所示，与对照组相比，游离 Tr 组、游离甘草酸组、游离 Tr+游离甘草酸组的肿瘤体积均有不同程度的减小，抑瘤率分别为 18.26%、56.80%、49.70%，说明 Tr 与甘草酸均具有一定的抗肿瘤活性。游离 Tr+游离甘草酸组对肿瘤的抑制作用甚至强于 Tr@CLN 组，这可能是由于甘草酸具有调节肿瘤相关巨噬细胞极化以及减少肿瘤新生血管生成作用，使得游离 Tr 与甘草酸联用抗肿瘤效果优于单用 Tr 的 Tr@CLN 组。

肿瘤新生血管标志物) 免疫组织化学分析并对肿瘤组织进行分化群 86 (cluster of differentiation 86, CD86, M1 型巨噬细胞标志物)、分化群 206 (cluster of differentiation 206, CD206, M2 型巨噬细胞标志物) 和小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体

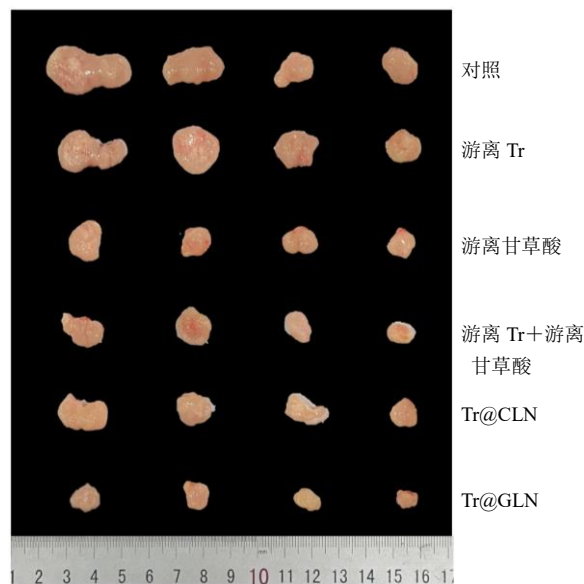


图 6 皮下荷瘤肝癌小鼠的离体肿瘤组织图

Fig. 6 *In vitro* tumor tissue diagram of subcutaneous tumor-bearing hepatoma mice

表 3 第 12 天各组小鼠离体肿瘤组织质量

Table 3 Weight of tumor tissue *in vitro* of mice in each group on day 12

组别	肿瘤组织质量/g
对照	0.99±0.30
游离 Tr	0.81±0.43
游离甘草酸	0.43±0.17
游离 Tr+游离甘草酸	0.50±0.18
Tr@CLN	0.57±0.16
Tr@GLN	0.21±0.08*

与游离 Tr 组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs free Tr group

表 4 治疗期间各组皮下荷瘤肝癌小鼠体质量变化

Table 4 Body weight changes of subcutaneous tumor-bearing hepatoma mice in each group during treatment

组别	体质量/g						
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d
对照	24.78±0.27	25.16±0.58	26.28±0.36	28.16±0.80	29.74±1.06	29.86±1.02	31.66±1.63
游离 Tr	25.54±0.89	25.54±0.74	26.76±0.85	28.60±0.68	29.60±0.84	30.38±1.78	31.36±1.64
游离甘草酸	25.96±0.53	26.36±0.43	26.70±0.53	28.06±1.07	29.82±0.86	30.42±0.56	31.76±0.76
游离 Tr+游离甘草酸	25.16±1.75	26.38±1.39	27.00±1.45	27.98±1.63	29.56±1.86	30.78±1.40	31.20±3.14
Tr@CLN	25.14±0.77	26.52±0.62	27.56±1.01	28.16±1.72	28.48±1.26	29.28±1.25	30.30±1.28
Tr@GLN	25.06±0.83	25.36±0.70	26.46±0.80	27.96±0.94	29.20±1.23	29.58±1.27	29.68±2.15

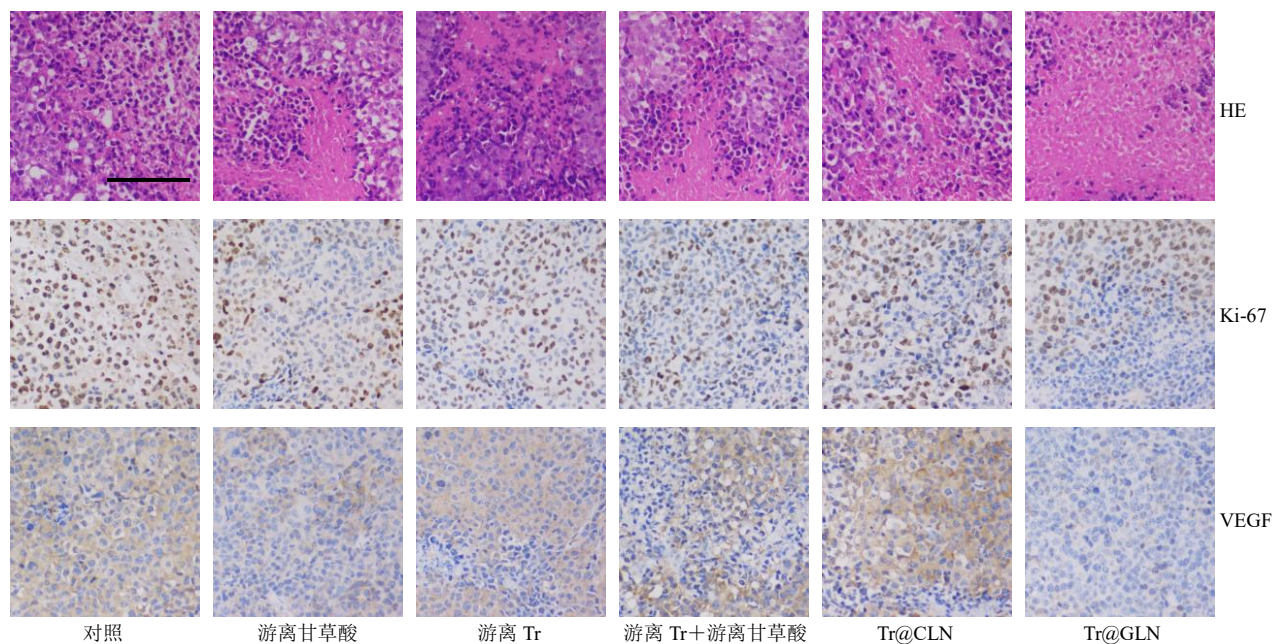


图 7 小鼠肿瘤组织中 Ki-67 和 VEGF 的 HE 染色和免疫组化染色 (比例尺为 100 μm)

Fig. 7 HE staining and immunohistochemical staining of Ki-67 and VEGF in tumor tissues of mice (scale bar is 100 μm)

甘草中另一主要成分, 研究发现其同样具有抗肿瘤血管新生作用^[34-36], 为了证实 Tr@GLN 可以促进肿瘤细胞凋亡和抗肿瘤血管新生, 通过 Ki67 和 VEGF 的免疫组织化学进行了评估。

(mouse EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1, F4/80, 总巨噬细胞标志物) 免疫荧光染色。结果如图 7 所示, 对照组的肿瘤细胞很少观察到凋亡或坏死, 而其他各治疗组均能观察到肿瘤细胞的细胞核呈现不同程度的皱缩和数量减少。其中 Tr@GLN 组的肿瘤细胞出现严重的凋亡损伤甚至坏死, 说明 Tr@GLN 具有最强的肿瘤细胞杀伤能力, 抗肿瘤效果优于 Tr@CLN, 这与上述动物实验结果相同。

课题组前期研究已经证实甘草次酸通过抑制肿瘤血管新生, 协同化疗药物抗肿瘤^[33]。甘草酸作为

结果显示, Tr@GLN 处理组 Ki67 阳性细胞数远低于对照组。游离 Tr 组和 Tr@CLN 组 VEGF 表达相比于对照组没有明显减少, 而游离甘草酸组、游离 Tr+游离甘草酸组与 Tr@GLN 组肿瘤新生血

管均有相应的减少,且 Tr@GLN 组 VEGF 的表达水平显著降低,表明甘草酸具有一定抑制肿瘤新血管形成能力且 Tr@GLN 具有更加优异的抗肿瘤新血管生成能力,这可能是由于 Tr@GLN 具有更加强烈的肿瘤靶向性。研究发现甘草酸具有多种活性,尤其对肿瘤相关巨噬细胞 (tumor associated macrophages, TAM) 极化调节作用,可能为其抗肿瘤免疫调节角度提供思路。采用免疫荧光染色对小鼠肿瘤组织进行 CD86、CD206 和 F4/80 免疫荧光染色探究 Tr@GLN 对肿瘤微环境中巨噬细胞调节作用。结果如图 8 所示,绿色荧光表示总巨噬细胞,红色荧光表示 M1 型巨噬细胞 (M1 TAM) 或 M2 型

巨噬细胞 (M2 TAM)。结果显示,对照组中标记 M1 TAM (F4/80⁺/CD86⁺) 的红色荧光最少,标记 M2 TAM (F4/80⁺/CD206⁺) 的红色荧光最多,经过治疗后,在给予甘草酸治疗的组中,M1 TAM 增加和 M2 TAM 减少较为明显,同时可以明显观察到 Tr@GLN 组的 M1 TAM 最多,M2 TAM 最少。上述结果提示甘草酸可以诱导肿瘤巨噬细胞向 M1 型极化,改善肿瘤免疫抑制,通过将甘草酸代替胆固醇制备为 GLLNP,不仅可以增加甘草酸在肿瘤部位的累积,同时使得载体自身具有药效,进一步逆转肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中的免疫抑制环境。

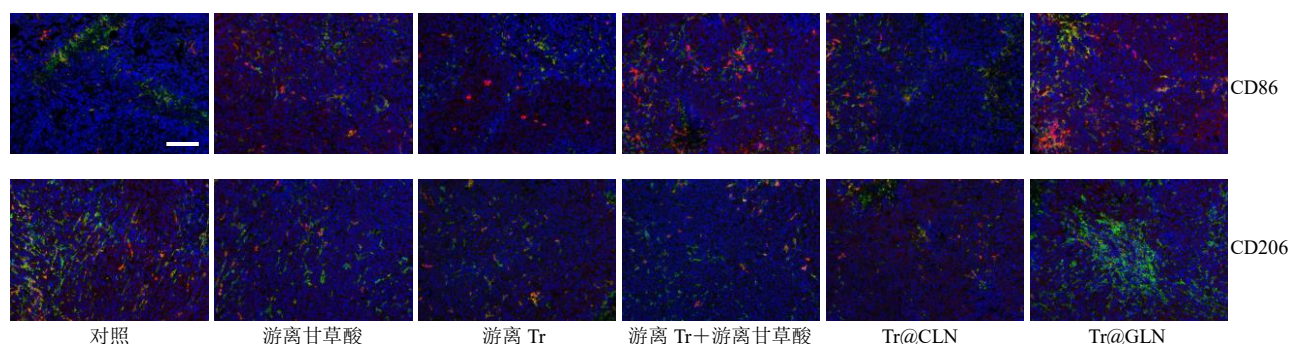


图 8 小鼠肿瘤组织中 CD206 和 CD86 的免疫荧光染色 (比例尺为 100 μm)

Fig. 8 Immunofluorescence staining for CD206 and CD86 in tumor tissues of mice (scale bar is 100 μm)

2.8 Tr@GLN 和 Tr@CLN 的体内生物安全性考察

考虑到 Tr 具有严重毒性,治疗结束后,收集各组小鼠主要组织器官 (心、肝、脾、肺、肾),经多聚甲醛固定后制成石蜡切片,进行 HE 染色,检测器官毒性。结果如图 9 所示,结果显示,游离 Tr 组肝脏组织病理学病变较对照组更严重,表现为肝细胞变性,细胞肿胀,胞质疏松淡染,淋巴细胞呈灶性浸润。然而,Tr@GLN 组的病变较轻,这表明肝损伤是由游离 Tr 给药引起的,所制备的制剂减少了 Tr 毒性,体内安全性较好。

3 讨论

纳米药物递送系统近年来在癌症治疗方面取得了显著成果。药物经纳米粒递送,可有效改善药物自身性质,增加药物在肿瘤组织的分布,延长药物在生物体内的滞留时间。然而,当 2 种药物共递送时存在基质效应和竞争关系,物理包载方式很难实现 2 种药物高包封率,药物比例难以稳定,而化学键合的方式,制备工艺复杂,难以实现转化。因此,亟需探索一种新的药物共载纳米递药体系的构建方式和思路。

“药辅合一”是中药制剂学中独特的用药理念、制药经验与哲学智慧。将药物作为纳米材料或替代原有材料的一部分,开发“药辅合一”的新型纳米递药系统有望解决这一难题。例如将中药活性成分白及多糖进行改性得到两亲性结构,在水中自组装形成负载多西紫杉醇的纳米粒,与人工合成的聚合物相比,天然多糖显示出许多有益的生物特性,包括无毒、生物降解性和非免疫原性同时通过抑制肿瘤细胞增殖抗肿瘤^[37]。除多糖外,生物大分子核酸因其尺寸小、结构稳定而灵活、编码性强、易于操作等优势,使其既可以作为纳米载体又可以作为核酸药物来解决生命科学中的重要问题^[38]。

本研究立足于目前研究最深入、产业化最成熟的纳米递药载体脂质体^[39],利用甘草酸替代传统脂质体的膜稳定剂胆固醇,制备“药辅合一”的新型脂质纳米粒,解决了传统脂质体靶向效率低、难以完全治疗复杂的 TME、胆固醇带来的不良反应等问题^[40-42]。然而本研究所制备的 GLN 仍然可能存在一些不足:(1)甘草酸作为一种皂苷类成分,存在一定溶血性,将其制备为脂质体是否能减少其带来

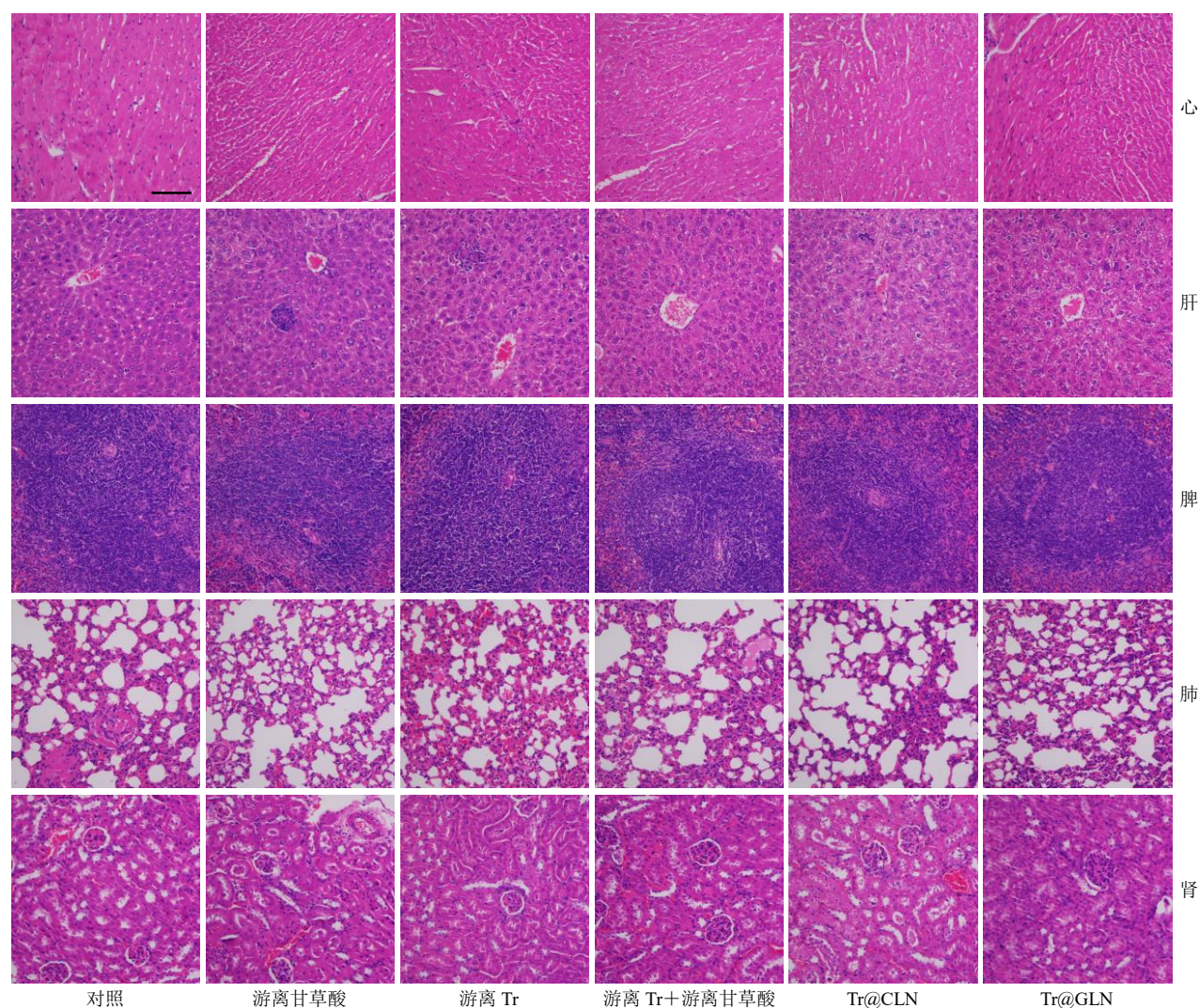


图 9 各组小鼠心、肝、脾、肺、肾的 HE 染色 (比例尺为 100 μm)

Fig. 9 HE staining of heart, liver, spleen, lung, and kidney of mice in each group (scale bar is 100 μm)

的溶血性亟需实验证明。(2) 研究发现, 脂质体的快速清除与网状内皮系统 (reticuloendothelial system, RES) 的不可逆摄取有关^[43]。脂质体进入生物介质后, 脂质体迅速与各种蛋白质结合形成蛋白冠, 被 RES 识别和捕获, 使得到达肿瘤部位的药物减少^[44-45]。因此, GLN 相比普通脂质体是否能减少蛋白冠的形成, 需要进一步验证。(3) Tr@GLN 还需要进一步研究在体外的抗肿瘤作用及机制。(4) GLN 能够增加肝癌 HepG2 细胞对药物的摄取, 但对于其体内的靶向能力还需后续实验证明。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen S R, Dai Y, Zhao J, *et al.* A mechanistic overview of triptolide and celastrol, natural products from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 104.
- [2] Yan P, Sun X T. Triptolide: A new star for treating human malignancies [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(Supplement): S271-S275.
- [3] Zheng Y W, Kong F H, Liu S Y, *et al.* Membrane protein-chimeric liposome-mediated delivery of triptolide for targeted hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 2033-2043.
- [4] Li Y J, Li S, Xue X Y, *et al.* Integrating systematic pharmacology-based strategy and experimental validation to explore mechanism of *Tripterygium* glycoside on cholangiocyte-related liver injury [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(4): 563-575.
- [5] Zheng W, Wang C, Ding R H, *et al.* Triptolide-loaded nanoparticles targeting breast cancer *in vivo* with reduced toxicity [J]. *Int J Pharm*, 2019, 572: 118721.
- [6] Zhao W, Xiao L P, Pan L Y, *et al.* Cardiac toxicity of *Tripterygium wilfordii* Hook F. may correlate with its

- inhibition to hERG channel [J]. *Heliyon*, 2019, 5(10): e02527.
- [7] Cheng Y X, Zhao Y H, Zheng Y. Therapeutic potential of triptolide in autoimmune diseases and strategies to reduce its toxicity [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 114.
 - [8] Dai W B, Wang X Y, Song G, *et al.* Combination antitumor therapy with targeted dual-nanomedicines [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 115: 23-45.
 - [9] Shi J F, Ren Y L, Ma J Q, *et al.* Novel CD44-targeting and pH/redox-dual-stimuli-responsive core-shell nanoparticles loading triptolide combats breast cancer growth and lung metastasis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 188.
 - [10] Wu Y H, Li J J, Zhong X M, *et al.* A pH-sensitive supramolecular nanosystem with chlorin e6 and triptolide co-delivery for chemo-photodynamic combination therapy [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2022, 17(2): 206-218.
 - [11] Luo Y Y, Li J J, Hu Y C, *et al.* Injectable thermo-responsive nano-hydrogel loading triptolide for the anti-breast cancer enhancement via localized treatment based on “two strikes” effects [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(11): 2227-2245.
 - [12] Large D E, Abdelmessih R G, Fink E A, *et al.* Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 176: 113851.
 - [13] Wang C G, Siriwardane D A, Jiang W L, *et al.* Quantitative analysis of cholesterol oxidation products and desmosterol in parenteral liposomal pharmaceutical formulations [J]. *Int J Pharm*, 2019, 569: 118576.
 - [14] 陈李霞, 丁越, 沈征武, 等. 胆固醇在脂质体中作用及甾醇、皂苷对其替换的研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(24): 6396-6404.
 - [15] 赵玮, 董玉虹, 付慧玲, 等. 食品中胆固醇氧化产物对人体健康影响的研究进展 [J]. *当代医学*, 2019, 25(12): 185-186.
 - [16] Wu Q Q, Wang Q T, Fu J F, *et al.* Polysaccharides derived from natural sources regulate triglyceride and cholesterol metabolism: A review of the mechanisms [J]. *Food Funct*, 2019, 10(5): 2330-2339.
 - [17] Folkard E J, Dowsett M. Influence of sex hormones on cancer progression [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(26): 4038-4044.
 - [18] Hong C, Liang J M, Xia J X, *et al.* One stone four birds: A novel liposomal delivery system multi-functionalized with ginsenoside Rh₂ for tumor targeting therapy [J]. *Nanomicro Lett*, 2020, 12(1): 129.
 - [19] Zhu Y, Liang J M, Gao C F, *et al.* Multifunctional ginsenoside Rg3-based liposomes for glioma targeting therapy [J]. *J Control Release*, 2021, 330: 641-657.
 - [20] Su X T, Wu L, Hu M M, *et al.* Glycyrrhizic acid: A promising carrier material for anticancer therapy [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2017, 95: 670-678.
 - [21] 刘帆. 甘草酸自组装体系对中药单体成分的增溶促稳作用及其配伍机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2020.
 - [22] 王若宁, 柳雨影, 陈健, 等. 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(23): 5876-5886.
 - [23] Selyutina O Y, Polyakov N E. Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier - From physicochemical properties to biomedical applications: A modern insight on the ancient drug [J]. *Int J Pharm*, 2019, 559: 271-279.
 - [24] Cao M Z, Gao Y, Zhan M L, *et al.* Glycyrrhizin acid and glycyrrhetinic acid modified polyethyleneimine for targeted DNA delivery to hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5074.
 - [25] Wang Q S, Gao L N, Zhu X N, *et al.* Co-delivery of glycyrrhizin and doxorubicin by alginate nanogel particles attenuates the activation of macrophage and enhances the therapeutic efficacy for hepatocellular carcinoma [J]. *Theranostics*, 2019, 9(21): 6239-6255.
 - [26] 崔桂林. 藤黄酸和阿霉素共载靶向脂质体在肝癌治疗中的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2022.
 - [27] Ao H, Wang Z, Lu L K, *et al.* Enhanced tumor accumulation and therapeutic efficacy of liposomal drugs through over-threshold dosing [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 137.
 - [28] Pando D, Matos M, Gutiérrez G, *et al.* Formulation of resveratrol entrapped niosomes for topical use [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 128: 398-404.
 - [29] Chen Y Q, Zhu W T, Lin C Y, *et al.* Delivery of rapamycin by liposomes synergistically enhances the chemotherapy effect of 5-fluorouracil on colorectal cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 269-281.
 - [30] 朱君君, 沈成英, 王镜, 等. 甘草酸-F127/TPGS 混合纳米胶束的制备及其大鼠在体肠吸收研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(7): 1845-1851.
 - [31] Stecanella L A, Bitencourt A P R, Vaz G R, *et al.* Glycyrrhizic acid and its hydrolyzed metabolite 18 β -glycyrrhetinic acid as specific ligands for targeting nanosystems in the treatment of liver cancer [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(11): 1792.
 - [32] Li J J, Tang F, Li R K, *et al.* Dietary compound glycyrrhetinic acid suppresses tumor angiogenesis and growth by modulating antiangiogenic and proapoptotic pathways *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Nutr Biochem*, 2020,

- 77: 108268.
- [33] Shi J F, Li J J, Li J X, *et al.* Synergistic breast cancer suppression efficacy of doxorubicin by combination with glycyrrhetic acid as an angiogenesis inhibitor [J]. *Phytomedicine*, 2021, 81: 153408.
- [34] Cai S J, Bi Z, Bai Y P, *et al.* Glycyrrhizic acid-induced differentiation repressed stemness in hepatocellular carcinoma by targeting c-Jun N-terminal kinase 1 [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1431.
- [35] Su X T, Wu L, Hu M M, *et al.* Glycyrrhizic acid: A promising carrier material for anticancer therapy [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2017, 95: 670-678.
- [36] Tang Z H, Li T, Tong Y G, *et al.* A systematic review of the anticancer properties of compounds isolated from licorice (Gancao) [J]. *Planta Med*, 2015, 81(18): 1670-1687.
- [37] Zhang G Y, Qiao J, Liu X, *et al.* Interactions of self-assembled *Bletilla striata* polysaccharide nanoparticles with bovine serum albumin and biodistribution of its docetaxel-loaded nanoparticles [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(1): 43.
- [38] 张丽丽. 基于核酸的新型多功能纳米载体的构建和应用研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2020.
- [39] Yan W, Leung S S, To K K. Updates on the use of liposomes for active tumor targeting in cancer therapy [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2020, 15(3): 303-318.
- [40] Pattni B S, Chupin V V, Torchilin V P. New developments in liposomal drug delivery [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(19): 10938-10966.
- [41] Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response [J]. *Cancer Lett*, 2017, 387: 61-68.
- [42] Chen C, Xia J X, Ren H W, *et al.* Effect of the structure of ginsenosides on the *in vivo* fate of their liposomes [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2022, 17(2): 219-229.
- [43] Sun X L, Yan X F, Jacobson O, *et al.* Improved tumor uptake by optimizing liposome based RES blockade strategy [J]. *Theranostics*, 2017, 7(2): 319-328.
- [44] Papi M, Caputo D, Palmieri V, *et al.* Clinically approved PEGylated nanoparticles are covered by a protein corona that boosts the uptake by cancer cells [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(29): 10327-10334.
- [45] Bigdeli A, Palchetti S, Pozzi D, *et al.* Exploring cellular interactions of liposomes using protein corona fingerprints and physicochemical properties [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(3): 3723-3737.

[责任编辑 郑礼胜]