

肝癌细胞膜嵌合的 TPP 修饰载羟基喜树碱脂质体的制备及抗肿瘤作用

吕景娣¹, 曾 琛^{2*}, 李 亚³

1. 驻马店市中心医院 药学部, 河南 驻马店 463000

2. 驻马店市中心医院 肿瘤内科, 河南 驻马店 463000

3. 河南中医药大学第一附属医院 中心实验室, 河南 郑州 450000

摘要: **目的** 制备肝癌细胞膜嵌合的 TPP 修饰 HCPT 脂质体 (HCPT@T/HM-L), 将 HCPT 高效递送到肝癌细胞线粒体, 充分发挥药物在靶细胞器的药效作用。 **方法** 采用薄膜水化法制备 HCPT@T/HM-L, 以挤压法将肝癌细胞膜嵌合在脂质体膜上, 测定粒径、 ζ 电位、电镜进行表征; 然后检测体外释放、溶血; 以香豆素 6 为荧光探针, 探索其胞内转运、线粒体靶向效果; 最后从肿瘤细胞和荷瘤小鼠模型上, 系统性评价肝癌细胞膜嵌合的 HCPT@T/HM-L 抗肿瘤效果。 **结果** HCPT@T/HM-L 在电镜下呈现为规则圆球、具有“核-壳”状结构, 粒径大约为 $(162.7 \pm 5.8) \text{ nm}$, ζ 电位为 $(12.4 \pm 1.8) \text{ mV}$; HCPT@T/HM-L 能促进载药系统的细胞摄取和靶向进入线粒体; 细胞药效结果显示, HCPT@T/HM-L 能很大程度上抑制肝癌细胞的生长, 降低线粒体膜电位、升高细胞内 ROS 和 Caspase-3 水平, 降低抗凋亡蛋白 Bcl-2, 提高促凋亡蛋白 Bax 表达, 从而增强药物促进肝癌细胞的大量凋亡; 荷瘤小鼠结果显示, HCPT@T/HM-L 能明显抑制皮下瘤的生长, 促使肿瘤细胞线粒体出现严重的功能障碍, 从而促进肿瘤细胞的大量凋亡; 细胞和动物试验结果均显示, HCPT@T/HM-L 具有很好的抗肿瘤效果, 明显优于其他组, 这可能与肝癌细胞膜的融合以及 TPP 阳离子的线粒体靶向作用有关。 **结论** HCPT@T/HM-L 可以高效递药到肝癌细胞线粒体, 促进肿瘤细胞的大量凋亡, 在精确治疗肿瘤方面具有较好的临床转化潜能。

关键词: 肝癌细胞膜嵌合; TPP 阳离子; 羟基喜树碱; 脂质体; 线粒体靶向; 肿瘤细胞凋亡

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2023)23 - 7765 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.019

Preparation and antitumor study of TPP-modified 10-hydroxycamptothecin-loaded liposomes embedded in hepatocellular carcinoma cell membranes

LYU Jing-di¹, ZENG Chen², LI Ya³

1. Pharmacy Department, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

2. Medical Oncology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

3. Central Laboratory of the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To prepare TPP-modified 10-hydroxycamptothecin liposomes (HCPT@T/HM-L) embedded in liver cancer cell membranes for the efficient delivery of hydroxycamptothecin to mitochondria of hepatocellular carcinoma cells to give full play to the efficacy of the drug in the target organella. **Methods** TPP-modified 10-hydroxycamptothecin liposomes were prepared by thin film hydration method, and liver cancer cell membranes were embedded on liposome membranes using the extrusion method, and characterized by particle size, ζ potential and electron microscopy; Then *in vitro* release and hemolysis were detected; Coumarin 6 was used as a fluorescent probe to explore its intracellular transport and mitochondrial targeting effects; Finally, the anti-tumor effects of chimeric TPP-modified 10-hydroxycamptothecin liposomes were systematically evaluated in tumor cells and tumor-bearing mice. **Results** HCPT@T/HM-L exhibited regular spheres with a “core-shell” structure under electron microscopy. The particle size was approximately $(162.7 \pm 5.8) \text{ nm}$, and the ζ potential was $(12.4 \pm 1.8) \text{ mV}$. The efficacy results showed that HCPT@T/HM-L largely inhibited the growth of hepatocellular carcinoma cells, decreased mitochondrial membrane potential, increased intracellular ROS and Caspase-3 levels, decreased anti-apoptotic protein Bcl-2, and increased the expression of pro-apoptotic protein Bax, thus enhancing

收稿日期: 2023-06-02

基金项目: 2020—2021 年度河南省中医药科学研究专项课题 (20-21ZY1019)

作者简介: 吕景娣, 女, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为药学、临床药学。Tel: 15093565387 E-mail: 412582454@qq.com

*通信作者: 曾 琛, 女, 汉族, 主治医师, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合肿瘤学。Tel: 13803969037 E-mail: 1354346491@qq.com

the promotion of massive apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by the drug; the results in ruminant mice showed that HCPT@T/HM-L significantly inhibited the growth of subcutaneous tumors and induced severe mitochondrial dysfunction in tumor cells, thus promoting massive apoptosis of tumor cells; Both cellular and animal test results showed that HCPT@T/HM-L had a great anti-tumor effect, which was significantly better than other groups, which might be related to the fusion of liver cancer cell membranes and the mitochondrial targeting effect of TPP cations. **Conclusion** HCPT@T/HM-L could efficiently deliver drugs to the mitochondria of hepatocellular carcinoma cells and promote massive apoptosis of tumor cells, which has good clinical translational potential in the precise treatment of tumors.

Key words: hepatocellular carcinoma cell membrane chimerism; TPP cation; 10-hydroxycamptothecin; liposome; mitochondrial targeting; tumor cell apoptosis

羟基喜树碱 (10-hydroxycamptothecin, HCPT) 是从植物喜树中提取的一种吡啶类生物碱, HCPT 不仅可以选择性抑制拓扑异构酶 I, 干扰细胞核 DNA 复制; 还能诱发细胞线粒体功能障碍, 导致线粒体膜电位降低, 细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平升高, 释放细胞色素 C, 引起肿瘤细胞大量凋亡^[1-2]。目前 HCPT 在治疗肝癌、肺癌、宫颈癌等多种恶性肿瘤方面具有较好的临床疗效^[3], 但是该药物存在水难溶性, 体内半衰期短, 缺乏肿瘤细胞线粒体靶向性等问题, 严重影响了该药物在临床上的预期疗效^[4]。因此, 寻求一种能提高药物的水溶性、增强 HCPT 的肿瘤细胞线粒体靶向性, 对于提高 HCPT 的临床疗效具有重要意义。

肿瘤组织血管丰富、内皮间隙较正常组织大, 普通脂质体难以进入细胞排列致密的正常组织, 可滞留在结构疏松、细胞间隙增大的肿瘤组织, 故在肿瘤部位具有较好的高渗透滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR)^[5]。尽管如此, 这些脂质体属于人工合成的载药系统, 可能会激活巨噬细胞等免疫细胞, 被当作“外来物质”予以清除。另外, 被动靶向在肿瘤部位的富集量也受制于肿瘤部位间隙较大的微环境结构, 靶向效率有限^[6-7]。据报道, 癌细胞膜包被的仿生给药系统依靠同源主动靶向和无免疫原性, 可以逃逸免疫系统的捕获, 靶向肿瘤细胞; 在此基础上带正电荷的三苯基膦 (triphenylphosphine, TPP), 可以吸附带负电荷的肿瘤细胞膜和线粒体膜, 促进药物载体靶向肿瘤细胞线粒体, 促使药物在线粒体部分充分发挥药效^[8]。因此, 本研究拟采用肝癌细胞膜包被脂质体提高 HCPT 的肿瘤细胞靶向性, 再借助于 TPP 阳离子的线粒体靶向性, 将 HCPT 高效递送到肝癌细胞线粒体效应部位, 充分发挥药物精确作用于靶细胞器的优势, 诱发肿瘤细胞线粒体功能障碍, 从而很大程度上增强 HCPT 诱导肝癌细胞凋亡效果。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Mastersizer 3000 型马尔文粒径分析仪、Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Tundra Cryo-TEM 型透射电子显微镜 (TEM), 赛默飞世尔科技公司; XPR226CDR/AC 型电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; LSM 900 型激光共聚焦显微镜, 卡尔蔡司光学 (中国) 有限公司; Cyto FLEX 型流式细胞仪, 美国贝克曼库尔特有限公司。

1.2 药品与试剂

羟基喜树碱, 批号 PS2207, 质量分数 >98.0%, 成都普思生物科技股份有限公司; 大豆卵磷脂, 批号 CB1242041, 质量分数 >98.0%, 上海源叶生物科技有限公司; 胆固醇, 批号 KJ221094, 质量分数 >95.0%, 默沙克生物科技有限公司; 甲氧基聚乙二醇-聚己内酯-氨基 (PEG_{2K}-PCL-NH₂), 批号 20221209, 质量分数 >95.0%, 西安瑞喜生物科技有限公司; 三苯基膦, 批号 20220919, 质量分数 >98.0%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 绿色荧光香豆素-6 (coumarin-6, C6), 批号 20220513, 质量分数 >98.0%, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 超滤离心管, 截留相对分子质量 10 000, 购自 Millipore 公司; 线粒体红色荧光探针 (Mito-Tracker Red), 批号 TS20221107, 赛默飞世尔科技公司; DAPI 溶液, 批号 20220918, 北京索莱宝科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒, 批号 A11015, 上海泽叶生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞

人源肝癌细胞系 HepG2 细胞由郑州大学医学院病理生理学教研室提供。

2 方法与结果

2.1 TPP-PEG-PCL 的合成和鉴定

参照文献方法^[9], 精确称取 5.4 mg TPP、5.1 mg EDC 和 3.1 mg NHS 置于二口烧瓶中, 加入 10 mL

二氯甲烷,在避光的环境下,反应 2 h 促使 TPP 的羧基活化。然后再加入 30 mg PEG_{2K}-PCL-NH₂ 与羧基进行酯化反应,从二口烧瓶开口处持续通入适量的氩气进行保护,室温反应 24 h,再采用透析方法除去小分子物质,将透析纯化后的溶液冷冻干燥,最终得到 TPP-PEG-PCL,收率大约 70%,采用 HPLC 检测纯度大约 95%(峰面积比)。采用核磁对化学结构进行鉴定,结果见图 1 所示,TPP 的三苯环峰大约在 δ 7.5 左右,PEG 和 PCL 的特征峰分别在 δ 3.5 和 δ 1.4 左右,由此标明,TPP-PEG-PCL 高分子聚合物已经合成。

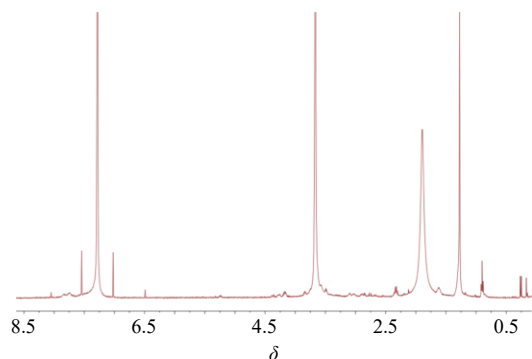


图 1 TPP-PEG-PCL 的 ¹H-NMR 图谱

Fig. 1 ¹H-NMR spectrum of TPP-PEG-PCL

2.2 TPP 修饰载药脂质体的制备

参照文献方法^[9],精确称取 HCPT 2 mg、胆固醇 4.4 mg、卵磷脂 17.1 mg、TPP-PEG_{2K}-PCL 20 mg,采用 30 mL 色谱甲醇溶解,置于旋转蒸发仪上,设定水浴温度为 40 ℃,旋转蒸发除去有机溶剂,再采用 10 mL PBS 进行水化,水化温度约 30 ℃,以 0.22 μm 针头式过滤器滤过 4~5 次,即可制备 TPP 修饰的载 HCPT 脂质体(HCPT loaded liposomes modified by TPP, HCPT@T-L)。

2.3 人肝癌细胞膜的制备

参照文献方法^[10],取人源肝癌细胞系 HepG2 细胞,加入到含有 10% FBS 的 DMEM 细胞培养体系中,于 37 ℃、5% CO₂ 培养条件下进行培养。待培养细胞长至约 80% 丰度时,离心收集细胞,吸除上清,收集细胞沉淀。采用适量冰浴预冷的 PBS 轻轻重悬细胞沉淀,洗涤细胞 2~3 次,将含有膜蛋白抽提试剂加入到沉淀细胞中,充分悬浮细胞,再用配好的 Tris 低渗溶液反复吹打,采用超声波细胞破碎仪将细胞充分破碎,取破碎后的细胞悬浮液,4 ℃ 条件下,1000×g 离心 10 min,去除未破碎的细胞和细胞核;取上清液再以 8000×g 离心 10 min,去

除下层线粒体;小心收集上清液转移至新的离心管中,再在 4 ℃ 条件下,以 20 000×g 超高速离心 60 min,取沉淀,加入生理盐水涡旋即得人源肝癌细胞系 HepG2 细胞膜悬液(HepG2 cell membrane, HM)。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测所得细胞膜的总蛋白,于-80 ℃ 冰箱保存备用。

2.4 人肝癌细胞膜嵌合 TPP 修饰载药脂质体的制备

参照文献方法^[9,11],将以上制备的人源肝癌细胞系 HepG2 细胞膜悬液和 TPP 修饰载药脂质体,按照 1:2 体积比混合,采用 Avanti 微型挤出器通过挤膜器(400、100 nm),大概来回 20 余次反复挤压,即可获得粒径比较均一的人肝癌细胞膜嵌合 TPP 修饰载药脂质体(HCPT@T/HM-L)。

2.5 HCPT@T/HM-L 的表征

2.5.1 形态学观察 将 HCPT@T/HM-L 采用生理盐水稀释,超声分散 10 min 后,滴于覆盖碳膜的铜网上,电风吹干,采用 TEM 观察脂质体的微观形态,结果如图 2-A 所示。TEM 结果显示,HCPT@T/HM-L 大致表现为规则的圆球形,呈现为明显的“核-壳”状结构,由此推测,人源肝癌细胞系 HepG2 细胞膜能较好的嵌合在脂质体外壳的表面。

2.5.2 膜蛋白检测 以 SDS-PAGE 电泳方法,采用考马斯蓝对人源肝癌细胞系 HepG2 细胞, HepG2 细胞膜、HCPT@T/HM-L 进行膜蛋白表征,结果如图 2-B 所示。SDS-PAGE 电泳结果显示,HCPT@T/HM-L 膜嵌合后仍保持与源细胞膜特征性蛋白,蛋白条带与源细胞膜一致,由此推测,HCPT@T/HM-L 膜嵌合功能性蛋白,如 CD47、Galectin-3 等可能基本保留^[9]。

2.5.3 粒径分布和 ζ 电位测定 以移液枪吸取少量 HCPT@T/HM-L,采用马尔文粒径分析仪测定脂质

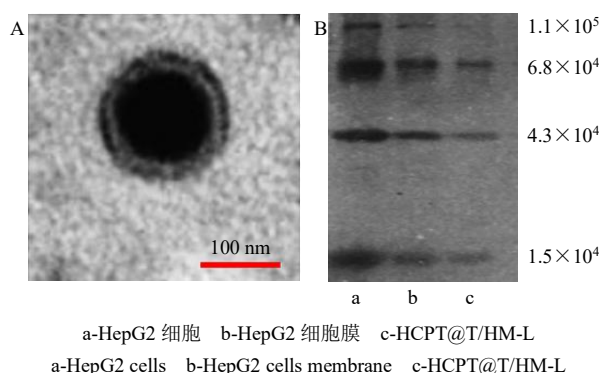


图 2 HCPT@T/HM-L 的 TEM 图 (A) 和膜蛋白检测 (B)
Fig. 2 TEM diagram (A), membrane protein detection (B) of HCPT@T/HM-L

体的粒径分布及 ζ 电位, 结果如图 3 所示。马尔文粒径仪检测结果发现, HCPT@T/HM-L 的粒径大约为 (162.7 ± 5.8) nm, ζ 电位为 (12.4 ± 1.8) mV, 两者均呈良好的正态分布, 由此推测 HCPT@T/HM-L 整个体系粒子大小相对比较均一, 分散性较好。

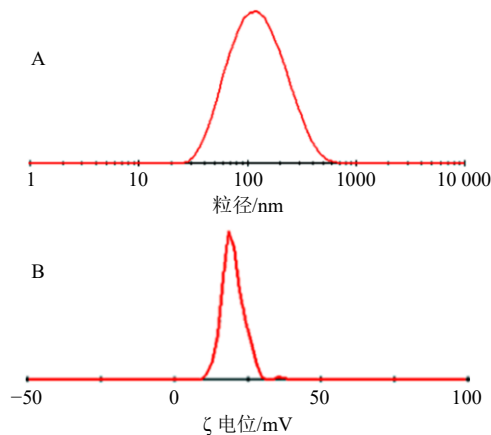


图 3 HCPT@T/HM-L 的粒径 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 3 Particle size (A) and ζ potential (B) of HCPT@T/HM-L

2.5.4 膜嵌合状态表征 将带红色荧光的 DiR 载入人肝癌细胞膜嵌合 TPP 修饰脂质体 (DiR@T/HM-L), 人肝癌细胞膜采用绿色荧光的 DiO 进行标记, 在激光共聚焦显微镜下进行观察, 由图 4 可见两者能很好的重合在一起, 显示明显的黄色, 由此表明, 人肝癌细胞膜与脂质体外周大豆卵磷脂很好的嵌合在一起。

2.5.5 载药量和包封率 吸取 HCPT@T/HM-L 溶液 5 mL, 置于超滤离心管内, 采用 12 000 r/min 高速离心 5 min, 离心出来的脂质体外游离的 HCPT, 截留在超滤离心管内的 HCPT@T/HM-L, 加入数倍体积的甲醇, 40 °C 水浴下溶解 5 min 破坏脂质体结构, 从而促使 HCPT 从脂质体中解离出来, 参照文献方法^[11], 测定脂质体外周游离的 $M_{外}$ 、脂质体包封的 HCPT 质量 ($M_{内}$), 将 HCPT@T/HM-L 溶液冷冻干燥, 称质量计为 M , 按照下列公式计算 HCPT@T/HM-L 的载药量和包封率。结果 HCPT@T/HM-

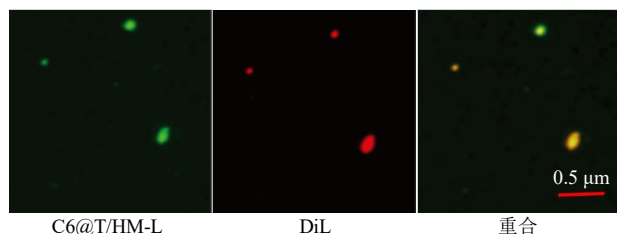


图 4 HCPT@T/HM-L 的膜融合状态

Fig. 4 Membrane fusion state of HCPT@T/HM-L

L 的载药量为 $(6.2 \pm 1.4)\%$, 包封率为 $(81.5 \pm 2.6)\%$ 。

$$\text{载药量} = M_{内}/M$$

$$\text{包封率} = M_{内}/(M_{外} + M_{内})$$

$M_{内}$ 为脂质体包封的 HCPT 质量, $M_{外}$ 为离心后游离 HCPT 质量, M 为 HCPT@T/HM-L 质量

2.6 体外评价

2.6.1 红细胞溶血 取大鼠血液, 3000 r/min 离心 (离心半径为 15 cm) 10 min 除去血浆, 取下层血细胞, 制成 5% 的红细胞悬液, 然后与含 HCPT 系列质量浓度的 HCPT@T/HM-L 溶液 (800、400、200、100、50、30 $\mu\text{g/mL}$) 进行等体积混合, 于 37 °C 培养箱中共同孵育 2 h, 2000 r/min 离心 (离心半径为 10 cm) 5 min, 取上层血红素测定吸光度, 以空白 PBS 为阴性对照, 蒸馏水为阳性对照, 测定各样品的红细胞溶血率, 各样品平行 3 份, 图 5 结果显示, HCPT@T/HM-L 的红细胞溶血率相对较低, 基本少于 5% 以下, 可用于注射给药。

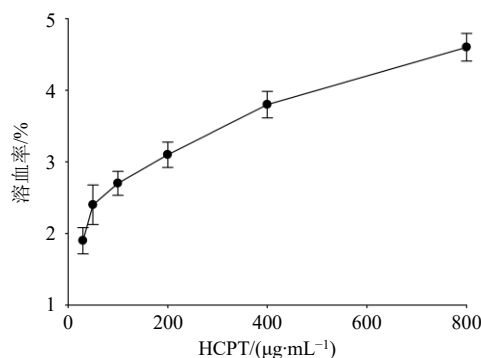


图 5 HCPT@T/HM-L 的红细胞溶血率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Erythrocyte hemolysis rate of HCPT@T/HM-L ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.6.2 体外释放 取 500 μg HCPT、HCPT@L、HCPT@HM-L 和 HCPT@T/HM-L (脂质体均含 500 μg HCPT), 置于 Spectrum Labs 透析袋 (截留相对分子质量为 3000) 中, 两端扎紧, 置于 100 mL pH 7.4 PBS 缓冲溶液中, 并加入聚山梨酯 80 作为表面活性剂, 增加 HCPT 在水中的溶解度, 以确保在释放过程中达到漏槽条件。将水温调节为 37 °C, 设置系列时间点 1、3、6、9、12、18、24、48、72、96 h 取样 0.5 mL, 同时补充等体积的 PBS, 计算 HCPT@T/HM-L 中 HCPT 的累积释放率, 各时间点样品平行 3 份, 结果见图 6, 游离的 HCPT 释放较快, HCPT@L 和 HCPT@T/HM-L 释放都较为缓慢, 其中以 HCPT@T/HM-L 释药速率最慢, 表现为良好的缓释性能, 可能与 HepG2 细胞膜嵌合后, 阻碍了

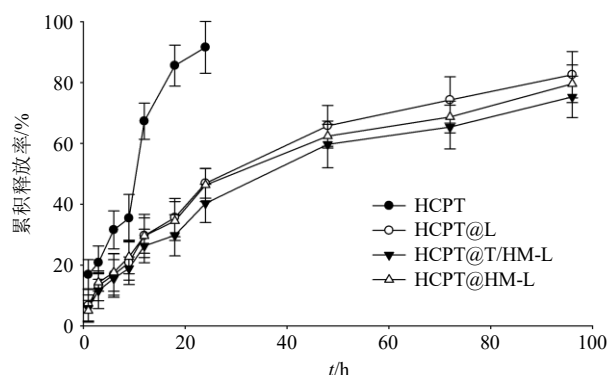


图 6 HCPT@T/HM-L 的体外释药特征 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 *In vitro* drug release characteristics of HCPT@T/HM-L ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物的释放有关。

2.7 细胞摄取

鉴于 HCPT 无荧光, 本研究采用绿色荧光 C6 载入脂质体中, 即可制备载 C6 普通脂质体 (C6@L)、载 C6 膜嵌合脂质体 (C6@HM-L)、载 C6 膜嵌合 TPP 修饰脂质体 (C6@T/HM-L), 将这些脂质体与游离香豆素 6 与人源肝癌细胞系 HepG2 细胞共同孵育 4 h, 以添加等体积 PBS 作为空白对照, 采用荧光显微镜定量检测人源肝癌细胞系 HepG2 细胞定量摄取香豆素 6 的荧光强度, 各组平行 3 份, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间均数差异采用 Student's *t*-test 进行检验 (以下统计方法同上), 代表性流式特征见图 7, 表 1 结果显示 C6@HM-L 的荧光强度值也相对较高, 由此推测, 人源肝癌细胞系 HepG2 细胞膜融合作用, 可能促进了药物的细胞摄取; 而 C6@T/HM-L 的荧光强度最高, 明显高于其他各组, 具有显著性差异, 这可能与膜同源性有利于脂质体的融合, 再由 TPP 阳离子吸附负电荷细胞膜, 进一步促

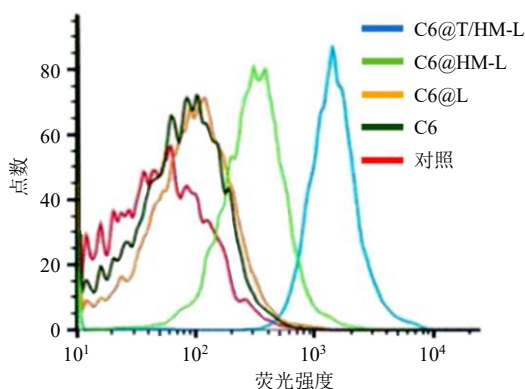


图 7 C6@T/HM-L 的细胞摄取荧光特征 ($n=3$)

Fig. 7 Fluorescence characteristics of cellular uptake of C6@T/HM-L ($n=3$)

表 1 各组细胞荧光摄取强度 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Fluorescence uptake intensity of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	荧光强度/AU	组别	荧光强度/AU
对照	25 188 ± 4860	C6@HM-L	557 887 ± 45 126*
C6	109 514 ± 6530	C6@T/HM-L	829 695 ± 21 191**
C6@L	300 670 ± 14 654		

与 C6@L 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 C6@HM-L 比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs C6@L; # $P < 0.05$ vs C6@HM-L

进细胞摄取有关。

2.8 线粒体靶向

鉴于 HCPT 无荧光, 本研究采用绿色荧光 C6 表征 HCPT 在肿瘤细胞内的线粒体靶向性^[12]。将肝肿瘤细胞株 HepG2 细胞接种到 12 孔培养板中, 培养 24 h, 再将 C6@T/HM-L 和 C6@HM-L 脂质体 (最终细胞溶液中 C6 质量浓度为 100 ng/mL) 共同孵育, 孵育 2、3 h 后, 于 35 °C 条件下, 以 50 nmol/L Mito Tracker™ Red 染线粒体 (红色) 5 min, 5 mg/mL Hoechst 33342 染细胞核 (蓝色) 5 min, 然后采用激光共聚焦显微镜观察 C6 在肿瘤细胞内的分布情况。结果见图 8, 绿色荧光的 C6@T/HM-L 脂质体与红色荧光线粒体重合后, 两者重合后变为黄色, 且随孵育时间黄色逐渐变深。

采用 Fiji-Image J 软件计算重合系数, 结果见表 2, C6@T/HM-L 的重合系数高于 C6@HM-L, 两者存在显著性差异, 由此推测, TPP 阳离子能促进脂质体聚集在肿瘤细胞线粒体部位。

2.9 促肝癌 HepG2 细胞凋亡作用

2.9.1 细胞培养 将肝癌 HepG2 细胞于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中进行培养, 培养箱中温度为 37 °C、5% CO₂, 根据试验需要接种于 96 孔板上。

2.9.2 细胞存活率测定 将肝癌 HepG2 细胞复苏传代, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养, 待生长至 80% 丰度时, 添加药物 (HCPT、HCPT@L、HCPT@HM-L 和 HCPT@T/HM-L) 进行处理, 设定给药质量浓度为 HCPT 10、20、40、60、80、100、150、200 mg/L, 各质量浓度平行 3 份, 加药后继续孵育 24、48 h, 添加 5 mg/mL 的 MTT 10 μ L, 培养 4 h 后, 再添加 200 μ L 二甲基亚砜, 轻微振荡 15 min, 然后采用酶标仪于 570 nm 波长, 检测各样品的吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率, 以只加 PBS 为阴性对照。结果见表 3 所示, 给药组后能显著减少肿瘤细胞存活率, 呈现明显的剂量和时间依耐性,

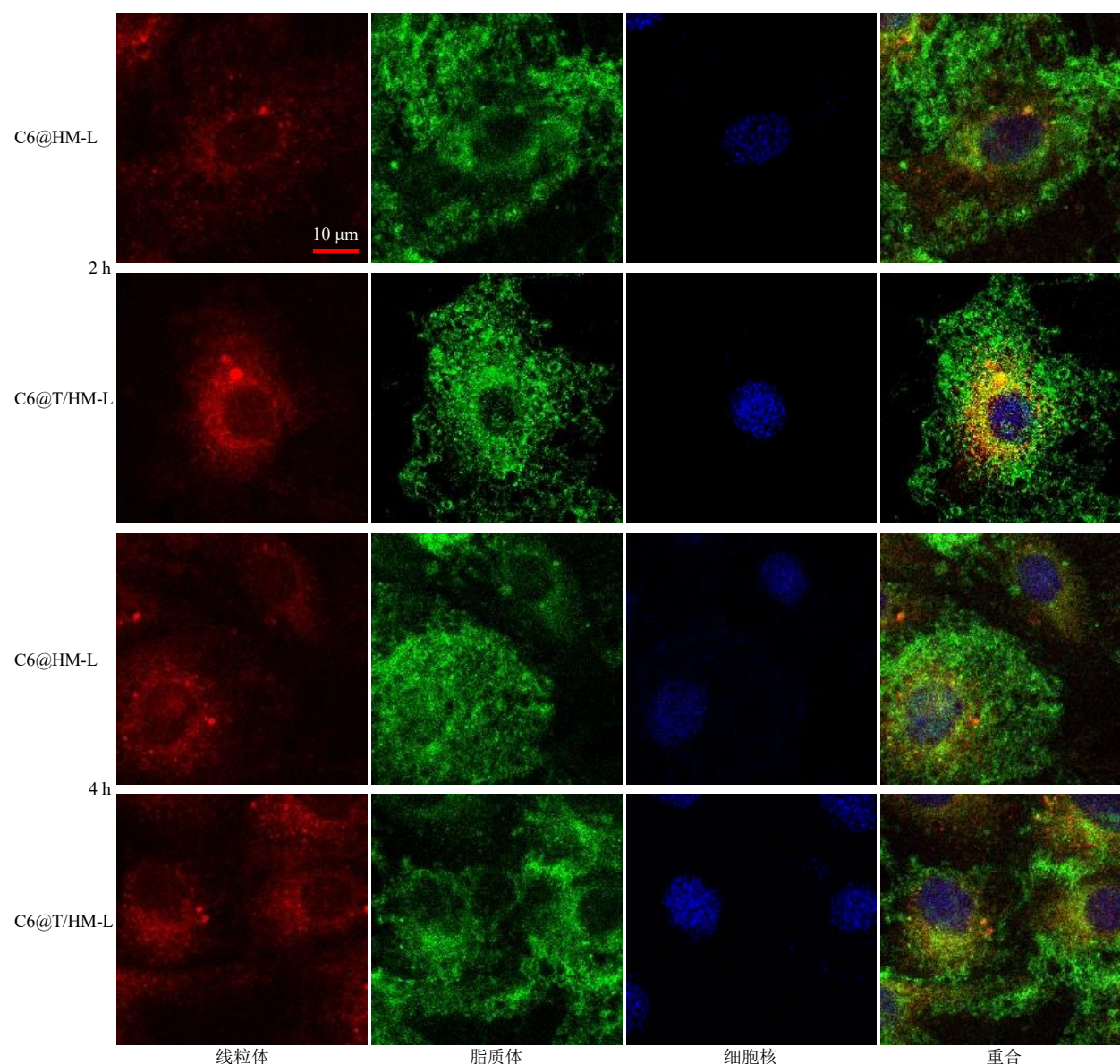


图 8 C6@T/HM-L 的线粒体靶向性

Fig. 8 Mitochondrial targeting of C6@T/HM-L

表 2 C6@T/HM-L 靶向线粒体后的重合系数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Recombination coefficients after C6@T/HM-L targeting of mitochondria ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	重合系数	
	2 h	4 h
C6@HM-L	0.28 ± 0.02	0.41 ± 0.07
C6@T/HM-L	$0.56 \pm 0.13^{##}$	$0.62 \pm 0.09^{##}$

与 C6@HM-L 比较: $^{##}P < 0.01$ $^{##}P < 0.01$ vs C6@HM-L

其中以 HCPT@T/HM-L 组抗肿瘤细胞生长效果最优, 表 4 结果显示 HCPT@T/HM-L 的 IC_{50} 明显小于其他各组, 可能与肿瘤细胞膜同源性融合, 以及 TPP 阳离子进一步靶向进入线粒体有关。

细胞存活率 = $A_{\text{给药}}/A_{\text{阴性对照}}$

2.9.3 Hoechst 染色阳性率的测定 取适量对数生长期的肝癌 HepG2 细胞, 于培养皿中生长至约 80% 丰度时, 添加药物进行处理 48 h, 分别为游离 HCPT、HCPT@L、HCPT@HM-L 和 HCPT@T/HM-L, 以添加等体积 PBS 为对照, 参照文献方法^[3], 设置孵育后药物质量浓度为 50 mg/L, 采用 5% Hoechst 33258 对细胞核进行染色, 通过统计软件计算 Hoechst 染色率, 如图 9 所表示, 给药组均可不同程度上促进肝癌 HepG2 细胞的凋亡, 细胞形态出现了明显的形态变化。尤其以 HCPT@T/HM-L 表现最突出, 该组细胞核形态出现颜色变暗, 碎块状致密浓染, 表 5 统计学结果表明, HCPT@T/HM-L 能很大程度上抑

表 3 不同给药质量浓度 HCPT 的 HCPT@T/HM-L 孵育 24、48 h 的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 HCPT with different concentrations of administration HCPT@T/HM-L cell survival rate after incubation for 24, 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	孵育 24 h 细胞存活率/%							
	10 mg·L ⁻¹	20 mg·L ⁻¹	40 mg·L ⁻¹	60 mg·L ⁻¹	80 mg·L ⁻¹	100 mg·L ⁻¹	150 mg·L ⁻¹	200 mg·L ⁻¹
HCPT	91.4±0.5	86.9±0.3	80.5±0.9	67.8±0.7	61.4±0.6	52.7±0.5	45.7±0.4	32.1±0.3
HCPT@L	87.9±0.6	83.7±0.8	72.9±0.6	59.8±0.4	46.7±0.5	35.8±0.7	30.7±0.4	25.4±0.3
HCPT@HM-L	85.5±0.8	81.4±0.6	71.2±0.5	55.4±0.7	39.5±0.3	28.6±0.6	20.9±0.4	19.7±0.5
HCPT@T/HM-L	81.3±0.6	76.5±0.8	68.3±0.4	51.6±0.9	35.4±0.5	25.6±0.3	18.4±0.2	15.4±0.6

组别	孵育 48 h 细胞存活率/%							
	10 mg·L ⁻¹	20 mg·L ⁻¹	40 mg·L ⁻¹	60 mg·L ⁻¹	80 mg·L ⁻¹	100 mg·L ⁻¹	150 mg·L ⁻¹	200 mg·L ⁻¹
HCPT	90.5±0.6	85.4±0.4	75.9±0.8	65.4±0.6	60.7±0.8	52.2±0.4	44.5±0.5	31.0±0.4
HCPT@L	85.6±0.7	82.4±0.6	71.5±0.8	58.2±0.5	45.8±0.6	34.7±0.6	28.4±0.5	24.3±0.2
HCPT@HM-L	83.6±0.6	79.4±0.5	69.2±0.8	54.3±0.6	38.5±0.2	27.4±0.5	19.4±0.6	18.6±0.7
HCPT@T/HM-L	80.3±0.5	75.9±0.6	67.4±0.5	50.9±0.8	34.2±0.6	24.7±0.4	17.9±0.3	16.8±0.5

表 4 HCPT@T/HM-L 的 IC₅₀ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 IC₅₀ of HCPT@T/HM-L ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	
	24 h	48 h
HCPT	75.1±4.7	68.4±3.8
HCPT@L	63.8±5.2	57.7±5.6
HCPT@HM-L	48.7±4.6	41.3±5.8
HCPT@T/HM-L	38.5±3.4	30.7±6.2

制肿瘤细胞生长,与其他各组比较存在显著性差异。

2.9.4 ROS 水平的测定 取适量对数生长期的肝癌 HepG2 细胞,于培养皿中生长至约 80% 丰度时,添加药物进行处理,分别为游离 HCPT、HCPT@L、HCPT@HM-L 和 HCPT@T/HM-L,以添加等体积 PBS 为对照,设置孵育时药物质量浓度为 50 mg/L,孵育 48 h 后,收集细胞,添加 10 μmol/L 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 荧光探针继续孵育 30

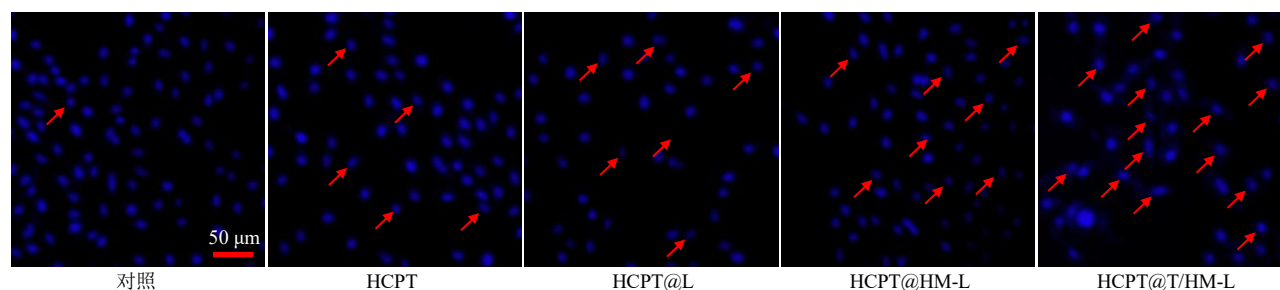


图 9 各组药物代表性的 Hoechst 染色阳性细胞 ($n = 3$)

Fig. 9 Hoechst stain-positive cells representative of each group ($n = 3$)

min, 再采用 PBS 洗涤细胞,采用定量荧光显微镜检测二氨基荧光素 (diaminofluorescein, DCF) 荧光强度,结果见图 10, HCPT@T/HM-L 处理后,肝癌 HepG2 细胞组的 DCF 荧光强度值最高 (表 6),由此推测,HCPT@T/HM-L 能促使肿瘤细胞内 ROS 水平升高,从而有助于抑制肿瘤细胞的生长。

2.9.5 线粒体膜电位和 Caspase-3 的测定 肝癌 HepG2 细胞的培养和药物孵育同上,药物处理后收集肿瘤细胞。参照文献方法^[13]采用 JC-1 (10 μg/mL) 荧光探针检测线粒体膜电位,以添加 PBS 作为对照组;以同样的方法,加入 Caspase-3 活性检测试剂盒

进行处理,结果见表 7, HCPT@T/HM-L 能很大程度上降低线粒体膜电位,提高细胞内 Caspase-3 活性,激活线粒体信息通路,引起肿瘤细胞大量凋亡。

2.9.6 凋亡相关蛋白表达的测定 肝癌 HepG2 细胞的培养和药物孵育同上,收集细胞,采用 Western blotting 检测凋亡相关蛋白的表达,经电泳、转膜、封闭、裁膜,将 PVDF 膜放入一抗稀释液 (Bcl-2、Bax、GAPDH) 中,在 4 °C 条件下用摇床摇 16 h,一抗孵育结束后,回收一抗,用 TBST 清洗膜 3 次 (100 r/min)。加入相应的二抗在常温条件下孵育 (40 r/h),孵育结束回收二抗,将膜放入显影仪中,在膜

表 5 各组药物处理后的 Hoechst 染色阳性率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 5 Positive Hoechst staining after drug treatment in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Hoechst 染色 阳性率/%	组别	Hoechst 染色 阳性率/%
对照	6.8±0.4	HCPT@HM-L	52.5±1.9*
HCPT	21.3±0.8	HCPT@T/HM-L	62.4±1.6**#
HCPT@L	36.9±1.7		

与 HCPT@L 比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 HCPT@HM-L 比较:
$P<0.05$, 图 5~9 同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs HCPT@L; # $P<0.05$ vs HCPT@HM-L, same
as figures 5—9

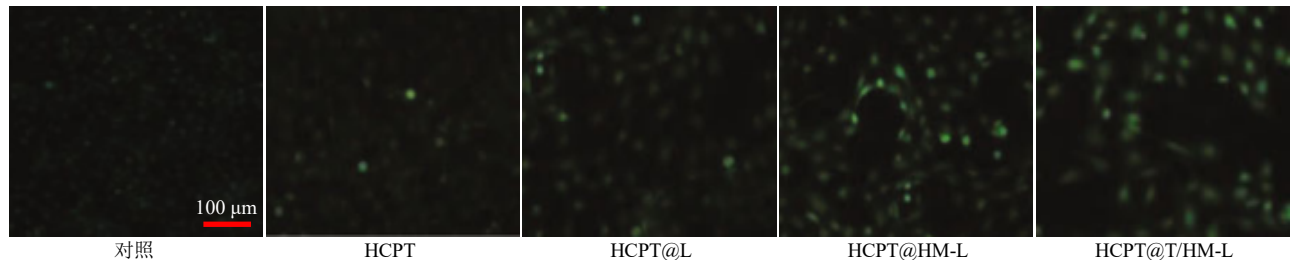


图 10 各组药物提高肿瘤细胞内 ROS 水平 ($n=3$)

Fig. 10 Each group increases intracellular ROS levels in tumor cells ($n=3$)

表 6 各组药物提高肿瘤细胞内 ROS 水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 6 Each group increases intracellular ROS levels in tumor cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	DCFH-DA 荧光强度	组别	DCFH-DA 荧光强度
对照	1021±52	HCPT@HM-L	17 788±1117*
HCPT	3786±504	HCPT@T/HM-L	27 691±958**#
HCPT@L	8127±545		

表 7 各组降低肿瘤细胞线粒体膜电位和提高细胞 Caspase-3 水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 7 Each group reduces tumor cell mitochondrial membrane potential and increase cellular Caspase-3 levels ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	线粒体膜电位	Caspase-3 水平
对照	98.9±0.61	0.99±0.02
HCPT	81.2±1.8	1.97±0.11
HCPT@L	64.4±2.1	3.16±0.22
HCPT@HM-L	52.3±1.5*	4.09±0.36*
HCPT@T/HM-L	44.2±1.9**#	5.27±0.29**#

将肝癌荷瘤小鼠随机分成 5 组, 分别为 PBS 组、HCPT 组、HCPT@L 组、HCPT@HM-L 组、HCPT@T/HM-L 组, 剂量均以 HCPT 计为 3 mg/kg, 每组 10 只, 分别在第 0、2、4 天向荷瘤小鼠的尾静脉注

上滴入 200 μ L 显影液, 对目标蛋白、内参进行显影。采用 Image J 软件进行灰度分析和统计学处理 (图 11)。结果见表 8, 所有药物孵育处理组, 呈不同程度的降低抗凋亡蛋白 Bcl-2, 提高促凋亡蛋白 Bax 表达, 以 HCPT@T/HM-L 组调节凋亡相关蛋白的表达最明显, 与其他组比较存在显著性差异。

2.10 抗肿瘤药效学

2.10.1 荷瘤模型的建立及分组给药 将肝癌 HepG2 细胞稀释成 1×10^7 个/mL 的细胞悬液, 采用 7 号针头注射 0.2 mL 于裸鼠右前肢腋下, 然后正常饲料喂养于 SPF 级动物房中。待皮下瘤长至 60~80 mm³,

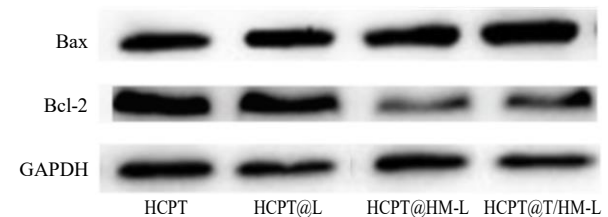


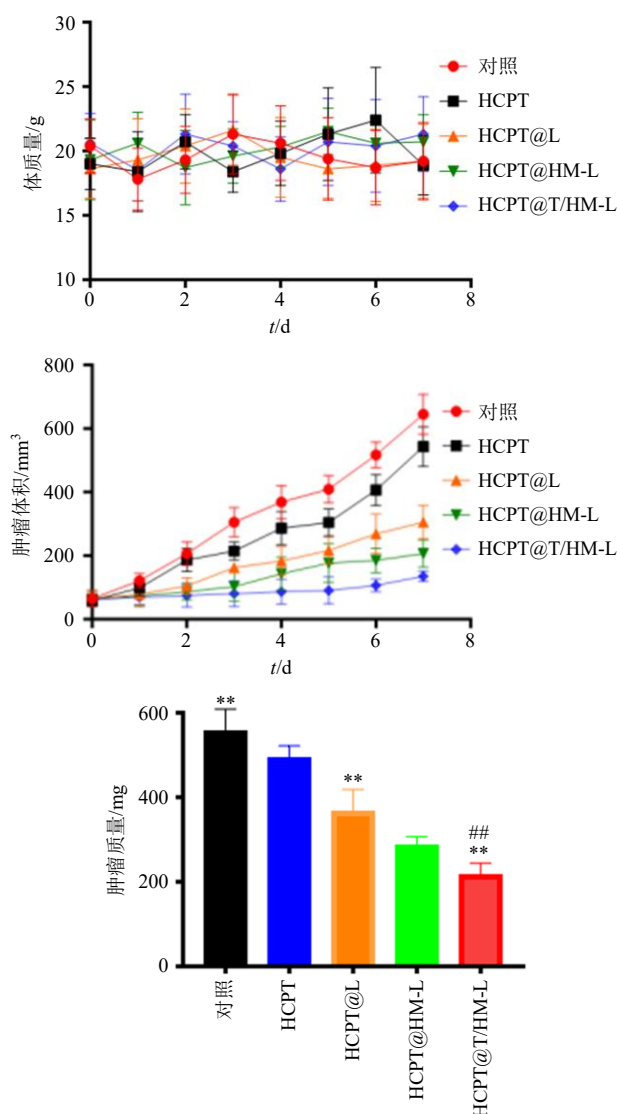
图 11 各组调控肿瘤细胞凋亡蛋白的表达 ($n=3$)

Fig. 11 Each group regulates expression of apoptosis-related proteins ($n=3$)

表 8 各组调控肿瘤细胞凋亡蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 8 Each group regulates expression of apoptosis-related proteins ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
HCPT	1.02±0.11	3.78±0.31
HCPT@L	2.09±0.06	2.75±0.58
HCPT@HM-L	3.12±0.28*	4.09±0.36*
HCPT@T/HM-L	3.98±0.56**#	5.27±0.29**#

射给药。给药后每天称量小鼠体质量, 测量小鼠皮下瘤瘤径, 按照上述公式计算肿瘤体积。给药 7 d 后, 以脊椎脱臼法处死小鼠, 然后取出皮下瘤, 进行称定质量。结果如图 12 所示, 对照组小鼠皮下瘤体积迅速增长, 药物处理后呈不同程度的抑制皮下瘤的增长, HCPT@T/HM-L 可以显著抑制皮下瘤体积; 给药后小鼠体质量并没有明显下降, 由此表明,



与 HCPT@L 比较: ** $P < 0.01$; 与 HCPT@HM-L 比较: ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs HCPT@L; ## $P < 0.01$ vs HCPT@HM-L

图 12 HCPT@T/HM-L 在荷瘤小鼠上的抗肿瘤效果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 12 Antitumor effect of HCPT@T/HM-L in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

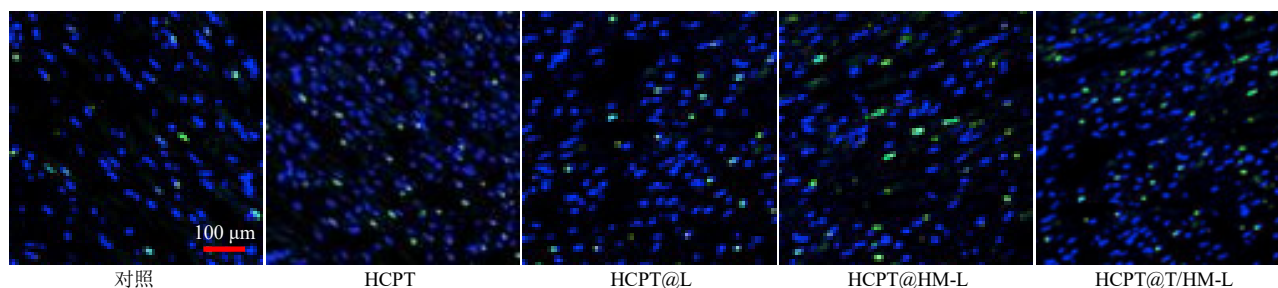


图 13 各组荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡情况 (TUNEL 阳性细胞率, $n = 10$)

Fig. 13 Each group promotes tumor cell apoptosis in tumor-bearing mice (TUNEL-positive cell rate, $n = 10$)

的萜烯生物碱类化合物, 具有很高的抗癌活性, 可选择性抑制拓扑异构酶 I, 可干扰 DNA 复制; 另外,

HCPT@T/HM-L 毒性相对较小; 7 d 后剥离皮下瘤体积, HCPT@T/HM-L 处理组的皮下瘤质量最小, 与其他各组比较, 存在显著性差异。

2.10.2 促肿瘤细胞凋亡 7 d 后取皮下瘤组织, 以 10% 中性福尔马林于 4 °C 固定 24~72 h, 常规石蜡包埋并切片, 厚度为 4 μm 。石蜡切片采用 TUNEL 染色的方法对凋亡心肌细胞进行识别, 显微镜下观察细胞核染成 TUNEL 阳性的细胞数目 (图 13)。结果见表 9, HCPT@T/HM-L 组的 TUNEL 阳性细胞比率最高, 明显高于其他各组, 由此表明 HCPT@T/HM-L 促肿瘤细胞凋亡效果最佳。

2.10.3 线粒体形态 取皮下瘤组织, 以 4% 戊二醛固定 48 h, 再与锇酸孵育 4 h, 然后采用环氧树脂包埋, 制作成切片, 以 4% 乙酸双氧铀染色, 置透射电镜下检测各组代表性线粒体形态, 结果见图 14。与生理盐水组比较, 药物处理组的线粒体形态发生了明显变化, 比如线粒体膜破裂, 线粒体内脊排列规格紊乱, 间隙明显增大。以 HCPT@T/HM-L 表现最为突出, 由此推测, HCPT@T/HM-L 能有限将 HCPT 载入肿瘤细胞线粒体效应部位, 从而促进线粒体功能发生障碍, 促进肿瘤的大量凋亡。

3 讨论

肝癌是最常见的、恶性程度较高的肿瘤之一, 对于早期的肝癌患者采用肝切除手术达到根治的目的^[14]。然而, 60% 肝癌在确诊时已处于肝癌分期 (China liver cancer staging, CNLC) 的 II~III 期 (中晚期), 处于中晚期的患者, 肝肿瘤负荷较大和转移严重, 促使情况较差的患者无法直接接受根治性手术^[15]。常采用大量的化疗药物进行控制肿瘤的生长, 随着肝癌发病历程的进程, 化疗药物对肝癌细胞的选择性会逐渐下降, 对正常细胞的损伤作用也逐渐凸显出来, 不良反应较多。HCPT 是我国研制

HCPT 还能诱导肝癌细胞凋亡前后线粒体疏水蛋白相对表达量发生变化, 线粒体膜电位下降, 启动细

表 9 各组荷瘤小鼠细胞 TUNEL 阳性细胞率 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 9 TUNEL-positive cell rate of apoptosis-promoting cells in hormonal mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	TUNEL 阳性 细胞率/%	组别	TUNEL 阳性 细胞率/%
对照	4.21 ± 0.47	HCPT@HM-L	31.25 ± 3.14*
HCPT	13.52 ± 1.48	HCPT@T/HM-L	41.53 ± 4.56***
HCPT@L	24.41 ± 3.52		

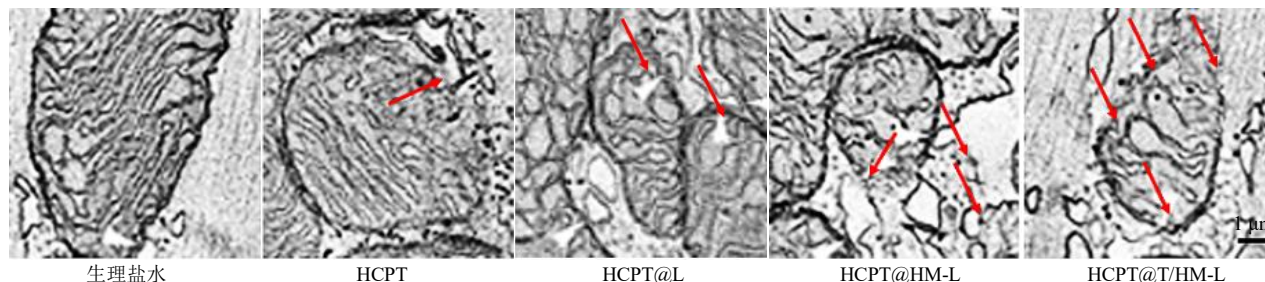


图 14 HCPT@T/HM-L 作用于荷瘤小鼠肿瘤细胞线粒体的电镜分析

Fig. 14 Transmission electron microscopic analysis of HCPT@T/HM-L on mitochondria of tumor-bearing mice

结果也显示, HCPT 能提高肝癌细胞内 ROS 水平, 降低线粒体膜电位, 诱发肝癌细胞大量凋亡。尽管如此, HCPT 缺乏肿瘤细胞靶向性, 给药后不能在肿瘤部位充分发挥药物的疗效。因此, 构建一种靶向给药系统, 高效递送 HCPT 到肿瘤细胞效应部位, 充分发挥药效, 具有较大的临床应用价值。

近年来, 随着应用型高分子材料在医学领域的逐步推广, 纳米微球、脂质体、凝胶等新制剂在提高药物的靶向性方面, 取得了突破性进展^[19]。仿生纳米材料目前被广泛研究于各个领域, 具备低免疫原性、低毒性和天然的同源靶向性等特点, 目前正成为一种极具前景的递药策略^[20]。脂质体等常规纳米载药系统可以提高组织中药物浓度, 但这些人工制备的纳米递药系统存在免疫原性问题, 容易被巨噬细胞系统识别和吞噬, 影响药物到达效应细胞器的药物浓度^[21]。故本研究采用人肝癌细胞膜嵌合在脂质体上, 增强同源靶向性, 将药物载体主动富集在肝肿瘤部位, 然后再借助 TPP 阳离子的线粒体靶向性能, 促进药物载体跨膜转运, 靶向进入线粒体效应部位, 充分发挥细胞器靶向给药的优势。肝癌细胞内转运试验结果显示 C6@T/HM-L 能明显促进胞内摄取, 并靶向进入线粒体, 可能与肿瘤细胞膜的同源靶向, 促进脂质体与肿瘤细胞膜的融合, 再由 TPP 阳离子的电荷吸引, 引导脂质体进入线粒体。目前文献表明 TPP 阳离子具有线粒体靶向性, 细胞膜带 30~60 mV 负电荷, 线粒体内膜带 150~180

胞凋亡通路, 从而促进肝癌细胞大量凋亡^[17], 目前也是肝癌常选用的化疗药物之一。如临床上的伊立替康、拓扑替康、贝洛替康等新一代喜树碱类药物陆续获批上市用于肝癌治疗。大量研究证实, HCPT 对人肝癌 SMMC-7721 细胞株、HepG2 细胞株均有抑制增殖与促进凋亡作用^[16-17], 另外, 载 HCPT 的脂质体对小鼠移植性肿瘤 H22 肝癌和 S180 肉瘤均有明显抑制作用, 且无明显的毒副作用^[18]。本实验

mV 负电荷, 两者均能吸引带正电荷的 TPP 阳离子, 故 TPP 阳离子聚集于线粒体的靶向能力可以提高 100~500 倍^[22-23], 由此推测, TPP 阳离子促使 C6@T/HM-L 克服高黏度细胞液的阻碍, 介导肿瘤药物进入线粒体效应部位, 故在肿瘤细胞线粒体的聚集量显著高于其他各组。随着线粒体效应部位药物聚集量增多, 细胞药效结果也表明, HCPT@T/HM-L 能显著降低线粒体膜电位, 提高 Caspase-3 活性和 ROS 水平, 调控凋亡相关蛋白的表达, 从而很大程度上提高药物促肿瘤细胞凋亡效果。根据细胞药效结果也能推测, HCPT@T/HM-L 能高效递送 HCPT 到肝癌细胞线粒体, 充分发挥药物作用于线粒体效应部位的优势, 从而很大程度上提高药物促肝癌细胞效果。动物试验结果显示, HCPT@T/HM-L 处理后, 能明显抑制皮下瘤的生长, Tunel 染色阳性率较高, 线粒体形态变化最突出, 出现了明显的线粒体膜破裂, 线粒体内脊排列规格紊乱等现象^[24]。由此推测, HCPT@T/HM-L 能将 HCPT 高效递送到肿瘤细胞线粒体, 从而促使病灶部位的线粒体形态发生了较大改变, 大量 HCPT 在线粒体效应部位发挥作用, 诱发线粒体功能障碍, 从而促进肿瘤细胞大量坏死和凋亡, 故可以很大程度上增强药物抗肿瘤效果, 显著抑制肿瘤组织的生长。

综上所述, HCPT@T/HM-L 粒径较小, 稳定性良好, 该载药系统可显著提高药物在线粒体部位的靶向性, 增强药物促肝癌细胞凋亡效果, 显著提高

药物的抗肿瘤活性, 具有较好的临床转化潜能。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang X, Yan X P. Analyte-driven self-assembly of graphene oxide sheets onto hydroxycamptothecin-functionalized upconversion nanoparticles for the determination of type I topoisomerases in cell extracts [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(26): 6761-6769.
- [2] Gao C F, Liang J M, Zhu Y, *et al.* Menthol-modified casein nanoparticles loading 10-hydroxycamptothecin for glioma targeting therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(4): 843-857.
- [3] Wei W, Shi S J, Liu J E, *et al.* Lipid nanoparticles loaded with 10-hydroxycamptothecin-phospholipid complex developed for the treatment of hepatoma in clinical application [J]. *J Drug Target*, 2010, 18(7): 557-566.
- [4] 周婷, 黎春燕, 李运, 等. 正交设计法优化羟基喜树碱脂质体处方工艺 [J]. *中药材*, 2019, 42(9): 2128-2132.
- [5] Yoshikawa T, Mori Y, Feng H T, *et al.* Rapid and continuous accumulation of nitric oxide-releasing liposomes in tumors to augment the enhanced permeability and retention (EPR) effect [J]. *Int J Pharm*, 2019, 565: 481-487.
- [6] Shin S, Ko H, Kim C H, *et al.* Curvature-sensing peptide inhibits tumour-derived exosomes for enhanced cancer immunotherapy [J]. *Nat Mater*, 2023, 22(5): 656-665.
- [7] Gao X H, Li S, Ding F, *et al.* A virus-mimicking nucleic acid nanogel reprograms microglia and macrophages for glioblastoma therapy [J]. *Adv Mater*, 2021, 33(9): e2006116.
- [8] Ozsvári B, Sotgia F, Lisanti M P. Exploiting mitochondrial targeting signal(s), TPP and bis-TPP, for eradicating cancer stem cells (CSCs) [J]. *Aging*, 2018, 10(2): 229-240.
- [9] Liu X J, Sun Y X, Xu S S, *et al.* Homotypic cell membrane-cloaked biomimetic nanocarrier for the targeted chemotherapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Theranostics*, 2019, 9(20): 5828-5838.
- [10] 杨洪宾, 余真妍, 闫洁, 等. 癌细胞膜伪装的纳米递药系统的初步构建与评价 [J]. *山西医科大学学报*, 2022, 53(2): 127-133.
- [11] 万子腾, 张跃, 姜建鑫, 等. 壳聚糖修饰绿原酸脂质体的制备及其体外透皮性能考察 [J]. *中国医药工业杂志*, 2023, 54(5): 760-765.
- [12] 安丽丽, 孙贺军, 孔永红, 等. 具有线粒体靶向功能的穿心莲内酯 TPP-PEG-PE 脂质体的制备及其作用于胃癌模型小鼠的机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(7): 1945-1956.
- [13] Elefantova K, Lakatos B, Kubickova J, *et al.* Detection of the mitochondrial membrane potential by the cationic dye JC-1 in L1210 cells with massive overexpression of the plasma membrane ABCB1 drug transporter [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1985.
- [14] Golse N, Adam R. Liver metastases from breast cancer: What role for surgery? Indications and results [J]. *Clin Breast Cancer*, 2017, 17(4): 256-265.
- [15] Zhou H Y, Song T Q. Conversion therapy and maintenance therapy for primary hepatocellular carcinoma [J]. *Biosci Trends*, 2021, 15(3): 155-160.
- [16] 刘利珍, 吴建兵, 黄丹红, 等. Celecoxib 联合羟基喜树碱对缺氧诱导的人肝癌细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(17): 3000-3005.
- [17] 李梦颖, 余飞, 侯冰雪, 等. 10-羟基喜树碱及其衍生物对肝癌细胞 HepG2 抑制作用的研究 [J]. *中医药导报*, 2015, 21(11): 34-35.
- [18] 陈文忠, 庄翌, 郝翌, 等. 羟基喜树碱脂质体的制备及其抗肿瘤效果的评价 [J]. *东南大学学报: 医学版*, 2020, 39(4): 407-412.
- [19] Guo Y, Wang M, Liu Q, *et al.* Recent advances in the medical applications of hemostatic materials [J]. *Theranostics*, 2023, 13(1): 161-196.
- [20] Xiao Z B, Zhao Q X, Niu Y W, *et al.* Adhesion advances: From nanomaterials to biomimetic adhesion and applications [J]. *Soft Matter*, 2022, 18(18): 3447-3464.
- [21] Chen Y K, Wang Z Z, Wang X F, *et al.* Advances in antitumor nano-drug delivery systems of 10-hydroxy camptothecin [J]. *Int J Nanomed*, 2022, 17: 4227-4259.
- [22] Weber C, Voigt M, Simon J, *et al.* Functionalization of liposomes with hydrophilic polymers results in macrophage uptake independent of the protein Corona [J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(8): 2989-2999.
- [23] Murphy M P. Targeting lipophilic cations to mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Bioenerg*, 2008, 1777(7/8): 1028-1031.
- [24] Sesso A, Belizário J E, Marques M M, *et al.* Mitochondrial swelling and incipient outer membrane rupture in preapoptotic and apoptotic cells [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2012, 295(10): 1647-1659.

[责任编辑 郑礼胜]