

• 药剂与工艺 •

载雷公藤红素的人参皂苷 Rg₃ 脂质体制备及其靶向治疗三阴性乳腺癌实验研究

孔昱欢^{1,2}, 张晓萍¹, 施经斌^{1,2}, 黄靖怡^{1,2}, 丁 烨¹, 陈姝桦¹, 熊 阳^{1,2*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

2. 浙江中医药大学中医药科学院, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 根据三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 细胞过度表达葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter type 1, Glut1), 而人参皂苷 Rg₃ (ginsenoside Rg₃, Rg₃) 的葡萄糖基可与 Glut1 底物高度结合的特点, 以 Rg₃ 为脂质体膜材, 制备包载雷公藤红素 (celastrol, Cel) 的靶向治疗 TNBC 的脂质体 (Cel/Rg₃-LPs), 并对其靶向行为及抗 TNBC 疗效进行考察。方法 采用薄膜分散法制备 Cel/Rg₃-LPs 并采用单因素考察法优化处方, 对优化处方的 Cel/Rg₃-LPs 进行形态、粒径、ζ 电位、体外释放和稳定性的考察; 通过 Cel/Rg₃-LPs 在体外鼠源 4T1 细胞的摄取实验、及对 BALB/c 原位荷 4T1 瘤株小鼠的治疗效果综合评价其靶向性。结果 Cel/Rg₃-LPs 优化处方为水化温度 50 °C, Cel 为 1.5 mg, Rg₃ 为 3.0 mg, 大豆磷脂为 21.0 mg, 制备得到的脂质体外观呈圆球形, 分布均匀, 其粒径和 PDI 分别为 (148.4±0.23) nm 和 0.19±0.01, ζ 电位为 (-29.70±0.34) mV, Cel 在脂质体中包封率为 (96.69±0.03) %, 载药量为 (5.62±0.01) %。Cel/Rg₃-LPs 在 4T1 细胞中的摄取作用显著增强, 且显著抑制 4T1 细胞增殖; 原位荷瘤小鼠体内实验表明, Cel/Rg₃-LPs 能降低肿瘤组织脂质, 并明显抑制肿瘤生长, 具有良好的肿瘤靶向性, 无明显肝肾毒性和组织毒性。结论 利用 Rg₃ 替代胆固醇作为脂质体膜材可使雷公藤红素具有较好的 TNBC 靶向性, 其药效相比胆固醇作为膜材显著增强, 值得进一步研究。

关键词: 雷公藤红素; 人参皂苷 Rg₃; 脂质体; 肿瘤靶向; 三阴性乳腺癌; 葡萄糖转运蛋白 1; 薄膜分散法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2024)13 - 4327 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.006

Preparation of ginsenoside Rg₃ liposomes loaded with celastrol and its targeted therapy for triple-negative breast cancer

KONG Yuhuan^{1,2}, ZHANG Xiaoping¹, SHI Jingbin^{1,2}, HUANG Jingyi^{1,2}, DING Ye^{1,2}, CHEN Shuhua¹, XIONG Yang^{1,2}

1. School of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China

2. Academy of Chinese Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective Based on the characteristics that triple negative breast cancer (TNBC) cells overexpress glucose transporter type 1 (Glut1) and the glucose moiety of ginsenoside Rg₃ (Rg₃) can be highly bound to Glut1 substrate, liposomes (Cel/Rg₃-LPs) loading celastrol (Cel) for TNBC therapy were prepared with Rg₃ as membrane materials and their targeting behaviour and anti-TNBC efficacy were investigated. **Methods** Cel/Rg₃-LPs was prepared by thin-film dispersion method and the prescription was optimized by single-factor experiment. The morphology, particle size, ζ potential, *in vitro* release and stability of the optimised Cel/Rg₃-LPs were investigated; The targeting property of Cel/Rg₃-LPs was thoroughly assessed by conducting uptake experiments with mouse 4T1 cells *in vitro*, as well as evaluating its therapeutic effect on BALB/c orthotopic 4T1 tumor-bearing mice. **Results** The optimized formulation of Cel/Rg₃-LPs comprised Cel 1.5 mg, ginsenoside Rg₃ 3.0 mg, and soybean lecithin 21.0 mg. The liposomes prepared at

收稿日期: 2024-03-22

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划 (202310344051); 浙江省自然科学基金项目 (LZ22H290001); 浙江省中医药科技项目 (2023ZL362)

作者简介: 孔昱欢, 女, 在读本科生。E-mail: 3072916488@qq.com

*通信作者: 熊 阳, 女, 教授, 博士生导师, 从事药物新剂型与新技术研究。E-mail: xiongyang@zcmu.edu.cn

a hydration temperature of 50 °C and exhibited a spherical morphology and uniform dispersion. The mean particle size and polydispersity index (PDI) were (148.4 ± 0.23) nm and 0.19 ± 0.01 , respectively, while the ζ potential was (-29.7 ± 0.34) mV. The encapsulation efficiency of celastrol in liposomes was $(96.69 \pm 0.03)\%$, and the drug loading capacity was $(5.62 \pm 0.01)\%$. Cel/Rg₃-LPs demonstrated significantly enhanced cellular uptake in 4T1 cells and significantly inhibited their proliferation. *In vivo* experiments using 4T1 orthotopic tumor-bearing mice indicated that Cel/Rg₃-LPs could reduce tumor tissue lipids, significantly inhibit tumor growth, exhibit good tumor targeting, and exhibit no apparent liver, kidney, or tissue toxicity. **Conclusion** Substituting Rg₃ for cholesterol as the liposomal membrane material improved the targeting efficacy of Cel to TNBC. The efficacy was significantly enhanced compared to using cholesterol as the membrane material, indicating the potential of Rg₃ liposomes for further research.

Key words: celestrol; ginsenoside Rg₃; liposome; tumor targeting; triple-negative breast cancer; glucose transporter type 1; thin-film dispersion method

三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 为女性最常见的恶性肿瘤^[1], 是雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 均为阴性且具高度侵袭性的乳腺癌亚型。由于缺乏公认的分子靶向治疗靶点, TNBC 患者对内分泌或分子靶向治疗不敏感, 临床治疗仍以化疗居多^[2], 但是疗效欠佳。

大量研究证明^[3-5], 肿瘤细胞内的脂质代谢变化影响许多癌细胞的生长增殖过程。癌细胞可以通过协调激活脂质合成代谢和相应的信号网络, 用于膜的形成、能量的储存以及信号分子的产生, 并且不断地通过脂质代谢来满足自身需求, 从而导致肿瘤细胞快速生长增殖。Gong 等^[6]研究表明, 癌症相关成纤维细胞分泌的脂肪酸和磷脂可以被结肠癌细胞摄取, 进而促进结肠癌细胞的迁移。Martin-Perez 等^[7]研究发现, 在肿瘤发展不同阶段, 脂质代谢普遍增强, 这不仅为肿瘤细胞提供能量, 有利于转移肿瘤细胞膜组成的变化, 还会触发信号通路传导和表观遗传事件改变。因此, 靶向性地降低肿瘤细胞内脂质是 TNBC 治疗的新思路。

雷公藤红素 (celastrol, Cel) 是一种从卫矛科雷公藤属及南蛇藤属植物雷公藤中分离出来的活性较高的五环三萜类物质, 具有很强的抗肿瘤活性^[8], 并且在调脂、调控脂代谢等方面作用显著^[9-10]。Cel 可以通过抑制脂质合成、促进脂质分解、阻断肠道脂质吸收, 并参与脂质转运和过氧化调节^[11]等途径, 切断肿瘤细胞对脂质的依赖。但 Cel 水溶性差、生物利用度低^[12], 并存在较大的毒性, 体内循环时, 易对正常组织细胞产生损害^[13]。因此, 改善 Cel 的水溶性并使其具有肿瘤靶向性尤为重要。

脂质体是一种以类脂质构成的双分子层为膜材

包含而成的微粒, 是常见的难溶性药物的载体, 具有安全性高、生物相容性好、载药能力强的特点, 它既可以提高药物的生物利用度, 又可以降低不良反应^[14]。胆固醇是制备脂质体的常用膜材, 但无法使脂质体具备主动靶向性。采用人参皂苷 Rg₃ (ginsenoside, Rg₃) 替代胆固醇可能是实现靶向到肿瘤的有效途径。有研究证明^[15], TNBC 细胞表面高度表达葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter type 1, Glut1)。Rg₃ 作为人参的主要有效成分之一, 其亲水侧链上存在 2 个葡萄糖基可与肿瘤细胞上的 Glut1 的底物结合, 并且 Rg₃ 拥有和胆固醇类似的结构, 具有嵌入脂质体膜并与磷脂相互作用作为稳定剂的潜力。故可将 Rg₃ 替代胆固醇制备脂质体, 既可以稳定脂质体结构, 又能实现脂质体的肿瘤靶向性。因此, 本实验根据 TNBC 细胞过度表达 Glut1、而 Rg₃ 与 Glut1 底物高度结合的特点, 采用 Rg₃ 与大豆磷脂为脂质体膜材, 制备包载同时具备抗肿瘤和调脂作用的 Cel 靶向治疗 TNBC 的脂质体 (Cel/Rg₃-LPs), 并对其靶向行为及抗 TNBC 疗效进行考察。

1 仪器与材料

1.1 仪器

M-1100-D 型旋转蒸发仪、WB-2000 型水浴锅, 杭州大卫科教仪器有限公司; JY92-IIN 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; DF-101S 型集热式磁力搅拌器, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; NanoZS90 型马尔文粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; J-15RIVD 型高速冷冻离心机, 贝克曼库尔特(美国)股份有限公司; Shimadzu UV-2550 型紫外分光光度计, 浙江省科学器材进出口有限责任公司; ME204 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; THZ-300C 型恒温培养箱, 美国 Thermo Fisher 公司; EnSpire 型酶标仪, 美国

PerkinElmer 公司; LSM880 型激光共聚焦显微镜, 德国 Carl Zeiss 公司; 日立 H-7650 型透射电子显微镜 (TEM), 日本日立公司。

1.2 药品与试剂

Cel, 质量分数 >98%, 批号 CKA352, 上海毕得医药科技股份有限公司; Rg₃, 质量分数 >98%, 批号 MUST-23020504, 成都曼思特生物科技有限公司; 注射用大豆磷脂 (质量分数 PC ≥ 10%)、胆固醇 (质量分数 >95%, 批号 L24F11F108900), 上海源叶生物科技有限公司; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-50, 批号 2011G50W9, 北京瑞达恒辉科技发展有限公司; DMEM 培养基, 批号 6123103, 赛默飞世尔 (苏州) 仪器有限公司; 香豆素-6 (coumarin-6, C6), 质量分数 >98.0%, 批号 C15210678, 上海麦克林生化科技有限公司; 胎牛血清, 批号 T220603H501, 杭州乐毅生物科技有限公司; 多聚甲醛 (批号 23108703)、四甲基偶氮唑蓝 (质量分数 ≥ 98%, 批号 EZ6688D183), 北京兰杰柯科技有限公司; 胰酶, 批号 8123016, 赛默飞世尔生物化学制品 (北京) 有限公司; DAPI 溶液, 批号 230800, 北京索莱宝公司; 磷酸盐缓冲液, 批号 GP22110021021043, 武汉赛维尔生物科技有限公司; 甲醇、三氯甲烷, 广东光华科技股份有限公司; 无水乙醇、二甲基亚砜 (DMSO, 批号 2018100), 上海麦克林生化科技有限公司; 其余试剂均为分析纯。

1.3 供试瘤株与实验动物

鼠源乳腺癌 4T1 细胞株由浙江中医药大学高建莉老师馈赠。雌性 BALB/c 小鼠, 5~6 周龄, 体重 16~18 g, 购买于上海斯莱克公司, 由浙江中医药大学实验动物研究中心饲养。所有的程序根据浙江中医药大学动物护理和使用委员会批准的协议进行, 医学伦理编号为 IACUC-20231218-08。

2 方法与结果

2.1 Cel/Rg₃-LPs 的制备

采用薄膜分散法制备脂质体, 精密称取处方量的 Cel、Rg₃、大豆磷脂至圆底烧瓶中, 加入等体积的无水乙醇和三氯甲烷 (1:1), 混合均匀, 超声至药物全部溶解, 分别在不同温度的恒温水浴条件下, 减压旋转蒸发 15 min, 得到质地均匀的脂质膜, 加入 4 mL 去离子水作为水化介质, 转移至相应恒温水浴锅内水化 30 min, 使用超声破碎仪超声 (功率为 30%, 超声 3 s, 间隔 2 s), 即得脂质体溶液。以相同的方法制备不含 Cel 的空白 Rg₃-LPs。

2.2 紫外分光光度法方法学考察

2.2.1 Cel 对照品溶液的配制 精密称取 Cel 对照品 25 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并定容至刻度线, 即得 1.000 mg/mL 的 Cel 对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液及空白脂质体对照溶液的配制 精密量取 1 mL Cel/Rg₃-LPs 于量瓶中, 加入适量甲醇, 振荡涡旋后用甲醇定容, 摇匀, 即得供试品溶液。同法配制空白 Rg₃-LPs 对照溶液。

2.2.3 专属性试验 分别取适量空白脂质体、Cel 对照品溶液, 用甲醇稀释至合适质量浓度, 在波长 200~800 nm 进行紫外吸收波长检测。结果所示, 在 425 nm 波长处 Cel 的吸收最强 (图 1-A), 且该波长下无干扰 (图 1-B)。因此后续研究在 425 nm 处进行分析与检测。

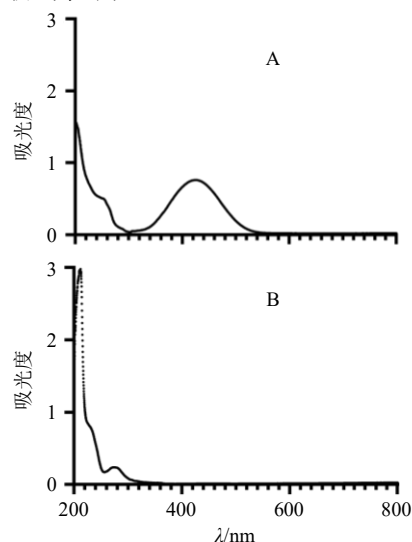


图 1 Cel 对照品 (A) 和空白 Rg₃-LPs (B) 的吸收曲线
Fig. 1 Absorption curves for Cel (A) and blank Rg₃-LPs (B)

2.2.4 线性关系考察 精密取 Cel 对照品溶液 30、60、90、120、150 μ L, 分别用甲醇配制成 3 mL 溶液, 摇匀, 制得质量浓度分别为 10、20、30、40、50 μ g/mL 的 Cel 对照品溶液, 在 425 nm 处, 测定其吸光度 (A), 每个质量浓度平均测定 3 次, 以质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 进行线性回归分析, 得回归方程为 $Y=0.0258X-0.0447$, $r=0.9995$, 结果表明 Cel 在 10~50 μ g/mL 线性关系良好。

2.2.5 精密度考察 精密吸取 Cel 对照品溶液适量, 配置成 20、30、40 μ g/mL 的对照品溶液, 重复实验 3 次, 平行测定 3 组, 测定其 A 值并代入回归方程计算得实际溶液质量浓度。所测得各质量浓度的 RSD 均低于 2%, 说明仪器精密度较好。

2.2.6 稳定性考察 精密吸取 Cel/Rg₃-LPs 供试品溶液适量, 配制成 20、30、40 μg/mL 的溶液, 平行测定 3 组, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24、48 h 时测定溶液 *A* 值。根据标准曲线计算得实际溶液质量浓度。所得各个质量浓度 RSD 均小于 3%, 结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 精密吸取同一批 Cel/Rg₃-LPs 样品, 加适量甲醇超声溶解, 制得供试品溶液。用甲醇稀释, 配制成 20、30、40 μg/mL 的供试品溶液, 平行测定 3 组, 根据标准曲线计算得实际溶液质量浓度。所测定各个质量浓度 RSD 均小于 1%, 说明采用方法重复性良好。

2.2.8 空白回收率考察 精密吸取 1 mL Cel 对照品溶液, 分别加入空白脂质体溶液中, 配制成质量浓度分别为 20、30、40 μg/mL 的 Cel 溶液, 平行测定 3 组, 测量 *A* 值计算药物质量浓度, 计算空白回收率。计算得各质量浓度的平均空白回收率分别为 100.51%、99.86%、98.49%, RSD 分别为 1.51%、1.31%、1.70%, 表明该方法 Cel 的空白回收率良好。

2.3 Cel/Rg₃-LPs 包封率及载药量的测定

葡聚糖 Sephadex G-50 凝胶粉末放入蒸馏水中煮沸 1 h, 使其充分溶胀备用。精密量取 Cel/Rg₃-LPs 混悬液 0.4 mL 于过葡聚糖凝胶柱, 室温下 3 000 r/min 离心 3 min (离心半径为 8.5 cm), 再加入 0.6 mL 纯化水, 室温 3 000 r/min 离心 3 min (离心半径为 8.5 cm), 得澄清脂质体溶液, 取等体积的柱前和柱后的脂质体溶液, 加甲醇, 超声 5 min, 破乳, 得供试品溶液 1 和供试品溶液 2。在 425 nm 波长处分别测定供试品溶液 1 和供试品溶液 2 的 *A* 值。将所测 *A* 值带入回归方程, 计算可得包封于脂质体中 Cel 的药量。载药脂质体的总质量为投入磷脂量与脂质体中药物量的总和。包封率和载药量计算公式如下。

$$\text{包封率} = A_1/A_2$$

$$\text{载药量} = W_{\text{Cel}}/W_{\text{总}}$$

*A*₁ 表示柱后溶液 *A* 值, *A*₂ 表示柱前溶液 *A* 值, *W*_{Cel} 表示包封于脂质体内 Cel 药量, *W*_总 表示载药脂质体的总质量

2.4 Cel/Rg₃-LPs 处方的单因素考察

以平均粒径、粒度分布 (PDI)、ζ 电位、包封率及载药量为指标对水化温度、药脂比、苷脂比 3 个因素进行考察。

2.4.1 水化温度的考察 按“2.1”项下的实验方法, 固定 Cel 为 1.5 mg、Rg₃ 为 3.0 mg、大豆磷脂为 21.0 mg, 分别在 45、50、55 °C 水浴条件下, 制备 Cel/Rg₃-

LPs。由表 1 可知, 在不同水化温度下制备 Cel/Rg₃-LPs 的包封率、载药量、粒径及 ζ 电位并没有显著差异。但水化温度为 50 °C 时制备的脂质体 PDI 较小, 且包封率和载药量最大, 故选用 50 °C 作为水化温度。

表 1 不同水化温度下制备 Cel/Rg₃-LPs 指标参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Index parameters of Cel/Rg ₃ -LPs preparation at different hydration temperatures ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)					
水化温度/°C	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
45	92.56±0.16	5.69±0.01	153.80±0.34	-30.90±0.54	0.22±0.02
50	97.47±0.04	5.87±0.01	156.90±0.77	-34.20±0.89	0.19±0.01
55	94.46±0.09	5.46±0.01	150.20±0.28	-30.60±1.56	0.22±0.01

2.4.2 药脂比的考察 按“2.1”项下的实验方法, 固定反应温度 (50 °C), 使用药脂质量比分别为 1:42、1:14、1:7 的 Cel 和大豆磷脂, 制备 Cel/Rg₃-LPs。由表 2 可知, 药脂比为 1:42 时虽然脂质体的粒径较 1:14、1:7 时制备的脂质体的粒径小, 但其包封率与载药量较低; 药脂比为 1:14、1:7 时制备的脂质体粒径相近, 比较二者的包封率时发现, 药脂比为 1:14 时包封率最高, 达 98.82%, 且载药量达 6.86%。故后续制备中药脂比选择 1:14。

2.4.3 苷脂比的考察 按“2.1”项下的实验方法, 固定反应温度 (50 °C), 药脂比为 1:14, 使用苷脂质量比分别为 1:14、1:7、2:7 的 Rg₃ 和大豆磷脂, 制备 Cel/Rg₃-LPs。由表 3 可知, 苷脂比为 1:

表 2 不同药脂比下制备 Cel/Rg₃-LPs 指标参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Index parameters of Cel/Rg ₃ -LPs preparation under different drug-lipid ratios ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)					
药脂比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
1:42	89.95±0.18	5.47±0.01	146.50±0.17	-35.80±0.19	0.25±0.01
1:14	98.82±0.05	5.78±0.01	174.70±0.34	-34.90±2.01	0.24±0.01
1:7	96.48±0.04	5.26±0.01	170.60±0.65	-36.60±1.77	0.26±0.01

表 3 不同苷脂比下制备 Cel/Rg₃-LPs 指标参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Index parameters of Cel/Rg ₃ -LPs preparation under different glucoside-lipid ratios ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)					
苷脂比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
1:14	94.54±0.06	5.19±0.01	160.10±0.26	-30.10±1.06	0.21±0.01
1:7	96.69±0.03	5.62±0.01	148.40±0.23	-29.70±0.34	0.19±0.01
2:7	95.44±0.12	5.41±0.01	159.50±0.63	-36.90±0.51	0.22±0.01

7 时制备的脂质体粒径较昔脂比为 1 : 14、2 : 7 时的脂质体粒径小, 包封率高, 达 96.69%, 且载药量达 5.62%。故选用昔脂质量比为 1 : 7 的 Rg₃ 和大豆磷脂。

2.5 Cel/Rg₃-LPs 的表征

2.5.1 形态学观察 吸取 Cel/Rg₃-LPs 样品液 10 μL, 滴在铜网上使形成一小液滴, 用滤纸吸弃多余液体, 然后用磷钨酸钠溶液染色, 静置 1 min, 晾干后在 TEM 下观察脂质体的形态。TEM 可以看出 Cel/Rg₃-LPs 的膜壁没有发生破裂, 外观呈现圆球形小囊泡, 脂质体体系粒径均一、分散性良好, 如图 2 所示。

2.5.2 粒径与 ζ 电位测定 以“2.1”项下的方法制备 Cel/Rg₃-LPs, 取离心过柱后的溶液, 稀释, 置马尔文粒度仪测定其粒径及 ζ 电位, 每份样品平行测定 3 次, 如图 3 所示。测得 Cel/Rg₃-LPs 的平均粒径为 (148.40±0.23) nm, PDI 为 0.19±0.01, ζ 电位为 (-29.70±0.34) mV。

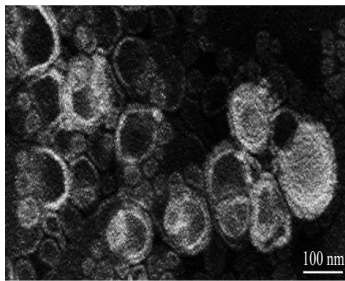


图 2 脂质体的 TEM 图
Fig. 2 TEM of liposomes

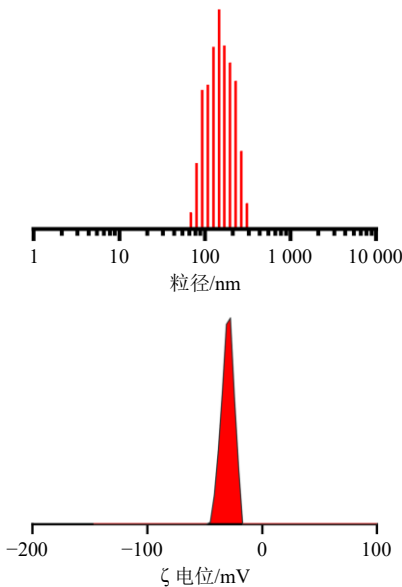


图 3 Cel/Rg₃-LPs 的粒径及 ζ 电位
Fig. 3 Particle size distribution and ζ potential of Cel/Rg₃-LPs

2.6 稳定性考察

2.6.1 储存稳定性 将最佳处方制备所得 Cel/Rg₃-LPs 溶液于室温下储存, 观察其外观变化, 脂质体溶液澄清透明, 无可见异物。分别于第 1、2、3、4、5、6、7 天用马尔文粒度仪测定粒径和 PDI, 考察 Cel/Rg₃-LPs 的储存稳定性。测得 Cel/Rg₃-LPs 的 7 d 内的储存稳定性如表 4 所示。储存 1 周后, 外观上脂质体溶液未出现明显变化, 且无沉淀生成。由表 4 可知, 与第 1 天相比, Cel/Rg₃-LPs 于室温条件下保存, 在放置 7 d 内的粒径及粒径分布指数均无明显变化, 表明本实验采用的处方与工艺条件能使制剂保持良好的稳定性。

表 4 Cel/Rg₃-LPs 的储存稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 4 Storage stability test results of Cel/Rg₃-LPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	粒径/nm	PDI	t/d	粒径/nm	PDI
1	145.67±1.14	0.24±0.01	5	145.00±1.28	0.24±0.01
2	146.30±1.22	0.24±0.01	6	146.83±0.59	0.23±0.01
3	145.77±1.18	0.22±0.01	7	145.57±1.00	0.23±0.01
4	145.73±0.31	0.23±0.01			

2.6.2 血清稳定性 将制备新鲜的 Cel/Rg₃-LPs 与等体积的含 10% FBS 的 DMEM 的血清溶液混合, 于 37 ℃, 100 r/min 孵育, 稀释 50 倍, 分别在 0、1、2、4、6、8、10、12、24、48 h 取样, 测定 Cel/Rg₃-LPs 的粒径及 PDI, 考察其血清稳定性。测得 Cel/Rg₃-LPs 的 48 h 内的血清稳定性如表 5 所示, 将 Cel/Rg₃-LPs 溶液与等体积 10% 的 DMEM 溶液混合后, 在 48 h 内, 脂质体粒径及 PDI 变化均较小, 表明本实验所采用的处方与工艺条件制备所得脂质体在血清中能较稳定存在。

2.7 体外释放

取 3 个 50 mL 离心管, 分别加入 30 mL 含 0.2% 聚山梨酯-80 的 PBS 作为释放介质, 将游离 Cel、Cel/Rg₃-LPs 的质量浓度统一为 0.2 mg/mL, 各取 1 mL

表 5 Cel/Rg₃-LPs 的血清稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 5 Serum stability test results of Cel/Rg₃-LPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/h	粒径/nm	PDI	t/h	粒径/nm	PDI
0	144.34±0.29	0.26±0.01	8	143.43±1.96	0.26±0.01
1	145.17±0.39	0.27±0.01	10	144.49±3.52	0.25±0.01
2	144.98±0.51	0.26±0.01	12	146.96±0.45	0.26±0.01
4	145.80±0.27	0.26±0.01	24	149.12±1.82	0.26±0.01
6	146.16±1.00	0.25±0.01	48	150.28±0.29	0.26±0.01

于透析袋，置于 37 °C 的摇床上，在 0、1、2、4、6、8、12、24 h 时取 2 mL 的溶液，并补充等量等温的释放介质，在 425 nm 下测定 A 值，测定结果如图 4 所示。由图 4 可知，游离 Cel 在 3 h 内释放速度较快，6 h 后药物释放完全，而 Cel/Rg₃-LPs 呈缓慢释放，在 12 h 时，累积释放率达 50%，表明该脂质体具有较好的缓释作用。

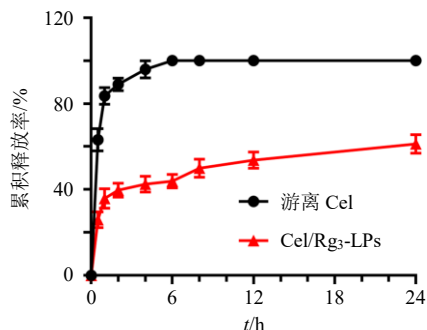


图 4 Cel/Rg₃-LPs 的释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Release curve of Cel/Rg₃-LPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.8 MTT 法检测 Cel/Rg₃-LPs 对 4T1 细胞增殖率的影响

将处于对数生长期的 4T1 细胞，胰酶消化，使其呈细胞悬液，接种于 96 孔板 (100 μ L/孔)，每 4 孔为 1 组，在 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后，对照组加入 100 μ L 的新鲜培养液，给药组加入 100 μ L 雷公藤红素脂质体 (Cel/Cho-LPs) 溶液或 100 μ L Cel/Rg₃-LPs 溶液，控制 Cel 溶液的质量浓度分别为 0.05、0.10、0.50、0.75、1.00、2.00 μ mol/L，孵育 48 h。弃去原培养液，用 PBS 溶液清洗 1 次，然后每孔加 100 μ L MTT 溶液 (0.5 mg/mL)，继续孵育 4 h 后弃上清液，每孔加入 150 μ L DMSO 终止反应，平板摇床震荡 10 min，待结晶充分溶解后，用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔 A 值，计算细胞存活率，并通过 Graphpad 软件 (Version 8.0.2)，计算相应的半数抑制浓度 (IC₅₀)。由图 5 所知，随着 Cel/Cho-LPs、Cel/Rg₃-LPs 浓度的增大，细胞存活率均呈现下降趋势，Cel/Cho-LPs 和 Cel/Rg₃-LPs 的 IC₅₀ 值分别为 0.89、0.66 μ mol/L。与 Cel/Cho-LPs 相比，Cel/Rg₃-LPs 的 IC₅₀ 值更低，表明 Cel/Rg₃-LPs 对 4T1 细胞具有更强的增殖抑制作用。

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

2.9 细胞摄取

按照“2.1”项的方法，制备成负载香豆素-6 的脂质体。取处于对数生长时期的 4T1 细胞，按照每

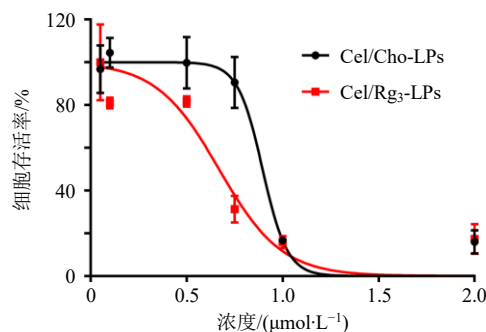


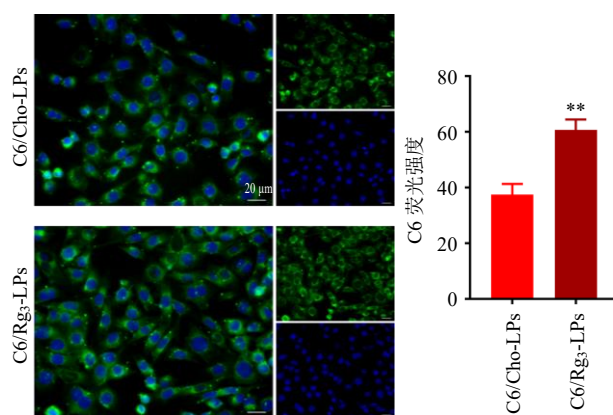
图 5 细胞存活率曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Cell survival curve ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

孔 1×10^5 个细胞接种于 6 孔板，设置 2 组，每组平行设置 3 孔，于恒温培养箱中培养 24 h。1 组每孔加入香豆素-6 脂质体 (C6/Cho-LPs)，另 1 组每孔加入包载香豆素-6 的 Rg₃ 脂质体 (C6/Rg₃-LPs)，与细胞共孵育 1 h。弃去培养基，用 PBS 润洗 3 次去除游离荧光脂质体。每孔加入 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min，用 PBS 清洗 3 遍，洗净残留的多聚甲醛固定液，之后每孔添加 70 μ L 细胞核染料 DAPI，染核 20 min。用 PBS 洗去染料后每孔加入 500 μ L PBS，用激光共聚焦显微镜观察，并定量分析 4T1 细胞的摄取情况。由图 6 可知，C6/Rg₃-LPs 组的绿色荧光强于 C6/Cho-LPs 组，说明 Rg₃ 可能通过其肿瘤靶向性增强 4T1 细胞对脂质体的摄取能力。

2.10 Cel/Rg₃-LPs 体内靶向性考察

2.10.1 荷瘤小鼠模型的建立 体外培养 4T1 细胞株，制成浓度为 5×10^6 个/mL 细胞悬液，置于冰上备用。取 0.1 mL 配制好的细胞悬液注射入 8 周龄左右的



与 C6/Cho-LPs 比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs C6/Cho-LPs.

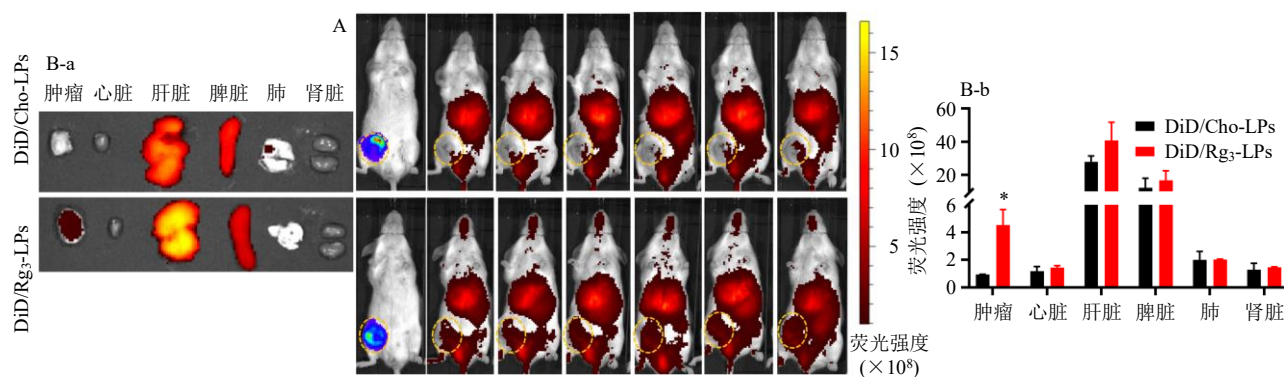
图 6 激光共聚焦显微镜观察不同膜材脂质体载香豆素-6 的细胞摄取及荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Uptake and fluorescence intensity of C6 liposomes prepared by different membrane materials observed by confocal laser microscopy ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

BALB/c 小鼠的右前肢外侧皮下的第 2 对乳房垫下成瘤,待肿瘤体积长至约 60 mm³ 后,进行下一步实验操作。

2.10.2 体内分布及原位肿瘤靶向评价 以 DiD 染料替代药物,按上述脂质体的制备方法制备荧光脂质体 (DiD/Cho-LPs 和 DiD/Rg₃-LPs),尾 iv 入小鼠体内。采用双模式活体成像,分析荧光信号和生物发光成像 (bioluminescence imaging, BLI) 信号在小鼠体内的共定位情况。小鼠用异氟烷气体麻醉,并 ip *D*-荧光素钾 (100 mg/kg),在体内成像系统 (*in vivo* imaging system, IVIS) 上进行生物发光成像,记录生物发光成像图,随后于 1、2、4、8、12、24 h 分别于 IVIS 中拍摄在体荧光图像。在最后 1 个时

间点之后,小鼠的肿瘤和 5 个主要器官 (心、肝、脾、肺、肾) 被解剖用于 IVIS 中拍摄离体荧光图像离体成像,用 Living image 软件 (Version 4.4) 定量荧光值。如图 7-A 所示,2 组原位肿瘤区域的荧光强度随时间增强,但对比于 DiD/Cho-LPs 组,DiD/Rg₃-LPs 组的体内成像证明 4T1 细胞摄取的 DiD/Rg₃-LPs 更多,并且在肿瘤部位的积累更多。离体器官的荧光图结果与也体内荧光成像结果一致 (图 7-B),在相同的信号,DiD/Rg₃-LPs 在肿瘤部位积累更多,根据定量分析结果表明,DiD/Rg₃-LPs 组在肿瘤部位的荧光值几乎是 DiD/Cho-LPs 给药组的 3 倍,这进一步证明 Rg₃ 作为脂质体的膜材具有较好的肿瘤靶向性。



A-荷 4T1^{Fluc} 瘤株的 BALB/c 小鼠自发光及不同时间点的体内荧光分布成像 (黄色圆圈表示原位肿瘤, $n=3$); B-离体器官的荧光成像 (a) 及荧光强度半定量 (b, $\bar{x} \pm s$, $n=3$); 与 DiD/Cho-LPs 比较: * $P<0.05$ 。

A-auto-fluorescence and *in vivo* fluorescence distribution imaging of BALB/c mice bearing 4T1^{Fluc} tumor strain at different time points (yellow circles indicate *in situ* tumor, $n=3$); B-fluorescence imaging (a) and semi-quantification of fluorescence intensity in isolated organs (b, $\bar{x} \pm s$, $n=3$); * $P<0.05$ vs DiD/Cho-LPs.

图 7 体内分布及原位肿瘤靶向评价

Fig. 7 *In vivo* distribution and *in situ* tumor targeting evaluation

2.10.3 调脂作用考察 采用油红 O 染色观察 Cel/Rg₃-LPs 靶向降低肿瘤组织内脂质的作用。于实验终点处死小鼠,取其肿瘤组织并固定于 4%多聚甲醛中将冰冻切片放入切片槽内并加入甲醛溶液没过切片组织,固定 20~25 min 后。倒去甲醛溶液,用蒸馏水缓慢冲洗 2 次,加入 60%异丙醇浸洗 20~30 s。弃去 60%异丙醇后,加入油红 O 染料工作液,浸染 10~20 min (工作液配制为油红 O 贮存液-超纯水=3 mL:2 mL,混匀后用中性滤纸进行滤过)。弃去染色液,60%异丙醇漂洗 20~30 s 至间质清晰。冷 PBS 洗 2~5 次,直到无多余染液。加入 Mayer 苏木素染色液,复染核 1~2 min。弃去染液后用蒸馏水冲洗 2~5 次,加入油红 O 缓冲液孵育 1 min,弃去。最后加入蒸馏水覆盖细胞并在显微镜下观察。

结果如图 8-A 所示,胞内脂滴普遍被油红 O 染成红色,相较于其他给药组,Cel/Cho-LPs 和 Cel/Rg₃-LPs 组肿瘤组织内脂滴明显减少。定量分析显示 Cel/Rg₃-LPs 组调脂能力优于 Cel/Cho-LPs 组 (图 8-B),推测 Cel/Rg₃-LPs 可实现靶向调节肿瘤脂质。

2.11 Cel/Rg₃-LPs 抗肿瘤作用

将荷瘤小鼠随机分成 4 组,分别为 PBS 组、Rg₃-LPs 组、Cel/Cho-LPs 组、Cel/Rg₃-LPs 组,每组 5 只。根据图 9-A 所示 Cel/Rg₃-LPs 的给药剂量为 1 mg/kg,以第 1 次给药记为第 0 天,每 2 天尾 iv,共 7 次。给药后每 2 天称量小鼠体质量,测量小鼠皮下瘤瘤径,按照以下公式计算肿瘤体积。肿瘤体积 (V) 和相对肿瘤体积增殖率 (X) 计算公式如下。

$$V=AB^2/2$$

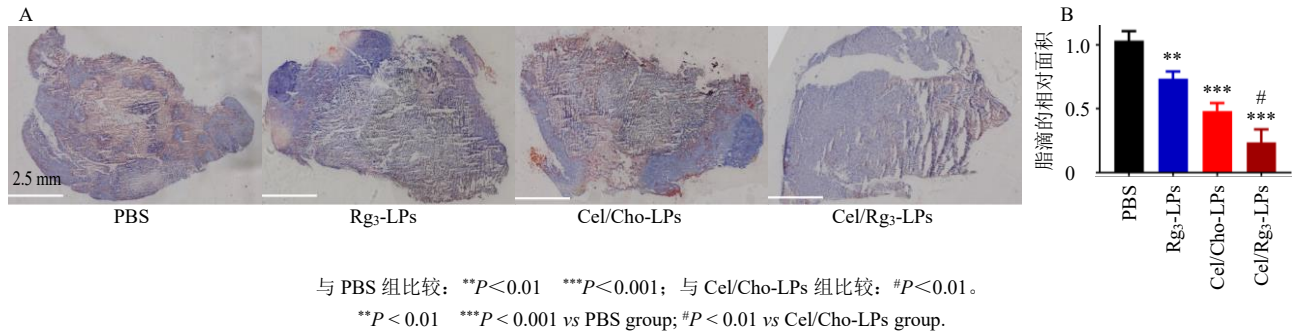
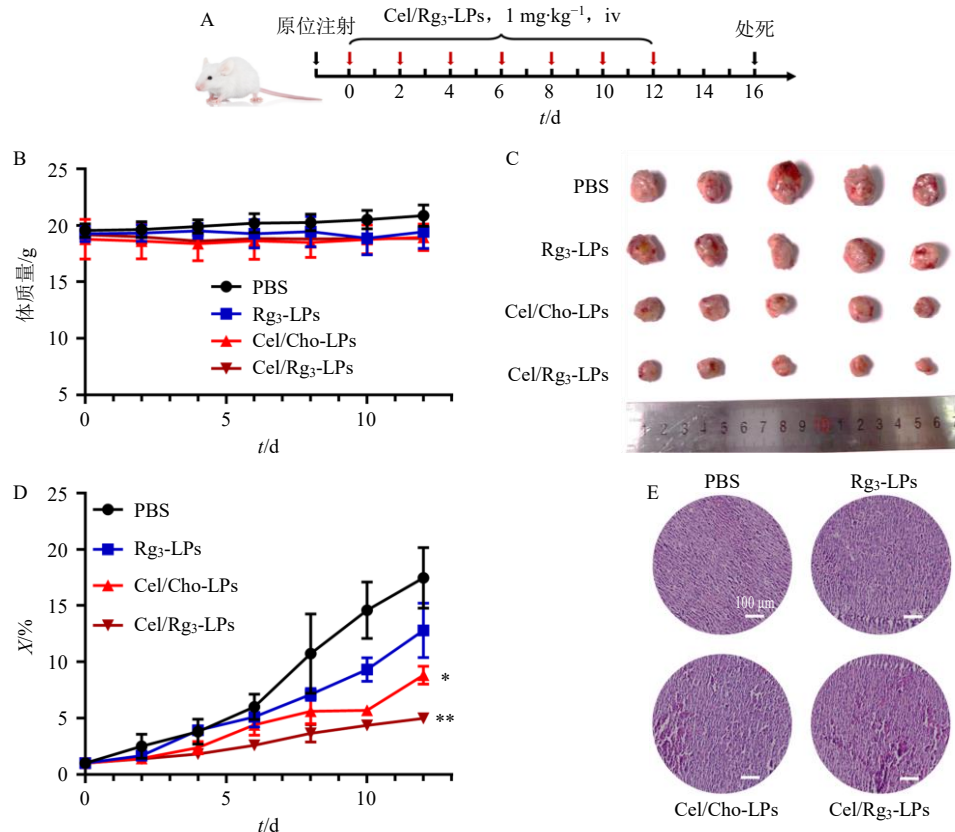


图 8 荷 4T1^{Fluc} 瘤株的 BALB/c 小鼠肿瘤组织油红 O 染色 (A) 及其定量分析 (B, $\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 8 H&E staining of tumor tissues of BALB/c mice bearing 4T1^{Fluc} tumor strain (A) and its quantitative analysis (B, $\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-荷 4T1^{Fluc} 瘤株的 BALB/c 小鼠原位模型治疗期间给药方案; B-荷 4T1^{Fluc} 瘤株的 BALB/c 小鼠体质量变化曲线 ($n = 5$); C-荷 4T1^{Fluc} 瘤株的 BALB/c 小鼠肿瘤形态图 ($n = 5$); D-荷 4T1^{Fluc} 瘤株的 BALB/c 小鼠相对肿瘤体积变化曲线 ($n = 5$); E-荷 4T1^{Fluc} 瘤株的 BALB/c 小鼠肿瘤组织的 H&E 染色 ($n = 3$); 与 PBS 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

A-administration plan of BALB/c mice bearing 4T1^{Fluc} tumor strain during *in situ* model; B-weight change curve of BALB/c mice bearing 4T1^{Fluc} tumor strain ($n = 5$); C-tumor morphology of BALB/c mice bearing 4T1^{Fluc} tumor strain ($n = 5$); D-relative tumor volume change curve of BALB/c mice bearing 4T1^{Fluc} tumor strain ($n = 5$); E-H&E staining of tumor tissues of BALB/c mice bearing 4T1^{Fluc} tumor strain ($n = 3$); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs PBS group.

图 9 体内抗肿瘤作用

Fig. 9 *In vivo* anti-tumor efficacy

$$X = V_t / V_0$$

A 为肿瘤的最长直径, B 为肿瘤的最短直径, V_0 为第 0 天测量所得肿瘤体积大小, V_t 为给药后每次测量时肿瘤体积大小

于实验终点, 颈椎脱臼处死各组荷瘤小鼠, 取其肿瘤组织, 并固定于 4% 多聚甲醛中。隔天组织块

取材, 脱水, 石蜡包埋、切片。烘片后, 脱蜡水化并依次用苏木素染液、伊红染液染色。脱水后用中性树脂封片, 于镜下观察。

给药后, 小鼠体质量均无明显下降, 无明显毒性见图 9-B。药效结果如图 9-C、D 所示, 对照组小

鼠皮下瘤体积快速增长, 给药后不同程度抑制肿瘤生长。空白 Rg₃-LPs 并无明显抑瘤作用, Cel/ Rg₃-LPs 相较于 Cel/Cho-LPs 组抑瘤效果更为显著。H&E 染色结果进一步证明了 Cel/Rg₃-LPs 的抗肿瘤药效 (图 9-E), 相较于其他给药组, 经 Cel/Rg₃-LPs 治疗后, 肿瘤细胞排列疏松, 胞核密度显著下降, 核膜损伤, 并出现部分肿瘤细胞伴随着凋亡和坏死现象, 其肿瘤细胞不完整、损伤等现象也更明显, 胞核发生最大程度的凋亡, 肿瘤组织出现严重坏死。

2.12 Cel/Rg₃-LPs 体内毒性评价

2.12.1 血液生化指标检测 于实验终点, 处死小鼠前, 摘除眼球取得全血, 静置至血清血浆分离, 4 ℃ 下 4 000 r/min 离心 15 min (离心半径为 8.5 cm), 吸取上清, 获得血清样本, 立即送至动物中心血液生化检测室检测, 结果如表 6 所示。相较于 PBS 组, 不同治疗组的不同治疗组的丙氨酸氨基转移酶 (alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酐 (creatinine, CREA) 均无产生显著变化, 说明各给药组未对肝、肾等器官产生明显的毒性作用。

表 6 血液生化指标 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Blood biochemical indexes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	AST/ (U·L ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	CREA/ (μmol·L ⁻¹)
PBS	170.93±25.98	27.60±2.82	5.87±0.51	35.43±4.54
Rg ₃ -LPs	165.93±6.85	28.73±1.40	6.33±0.15	34.43±3.06
Cel/Cho-LPs	165.37±7.78	27.53±2.06	6.03±0.35	35.60±0.79
Cel/Rg ₃ -LPs	159.97±27.87	29.30±2.35	6.24±0.42	34.03±1.68

2.12.2 组织 H&E 染色 采用 H&E 染色观察各给药组主要器官 (心、肝、脾、肺、肾) 的细胞形态变化进行组织学分析, 评价其生物安全性。于实验终点, 处死小鼠, 取其主要器官并固定于 4% 多聚甲醛中。组织块取材, 脱水、石蜡包埋、切片, 组织切片于 60 ℃ 烘箱中烘干, 脱蜡至水, 依次用苏木素染色液、伊红染色液染色, 染色后用中性树脂封片, 于镜下观察, 结果见图 10。与 PBS 组比较, 各给药组治疗后心脏、肝脏、肺、脾脏和肾脏没有明显的组织学损伤, 说明各给药组均无明显组织毒性。

3 讨论

本研究通过薄膜分散法制备 Cel/Rg₃-LPs, 以脂

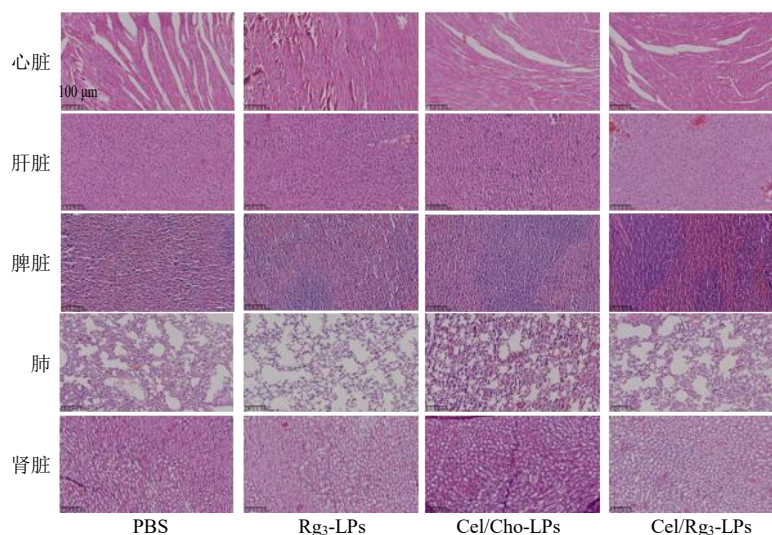


图 10 荷 4T1^{Fluc} 瘤株的 BALB/c 小鼠主要脏器的 H&E 染色

Fig. 10 H&E staining of main organs of BALB/c mice bearing 4T1^{Fluc} tumor strain mice

质体的粒径、PDI、ζ 电位、包封率和载药量作为评价指标, 对水化温度、昔脂比、药脂比进行考察, 优化其制备工艺。Cel/Rg₃-LPs 优化处方为水化温度 50 ℃, Cel 为 1.5 mg, Rg₃ 为 3.0 mg, 大豆磷脂为 21.0 mg。通过优化所得的脂质体粒径较小、分布较均匀、包封率较高、稳定性较好。在体内外实验中, 均表现出了较为理想的靶向抗肿瘤效果, 并在体内

表现出降低肿瘤部位脂质的作用, 并且未见到明显肝肾毒性和组织毒性。

Cel 具有显著的抗肿瘤活性, 其通过调控磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 和信号

转导子与激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 等多种信号通路抑制肿瘤增殖、侵袭和转移和诱导肿瘤细胞凋亡的作用已被相关研究验证^[16]。有研究证明, Cel 可用于治疗三阴性乳腺癌^[17]、肾细胞癌^[18]、肝细胞癌^[19]、卵巢癌^[20]等多种肿瘤。此外, 大量研究证明 Cel 可以通过调节脂质谱和相关代谢过程(包括脂质合成、分解代谢、吸收、运输和过氧化)调控脂质代谢^[11]。Liu 等^[21]发现 Cel 作为瘦素增敏剂, 通过减少食物摄入以及增强能量消耗等方面控制小鼠体质量, 降低脂质。Ma 等^[22]确定热休克因子 1 (heat shock factor 1, HSF1) 是脂肪组织和肌肉中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , PGC-1 α) 的上游激活剂, 并证明 Cel 具有 HSF1 的药理激活和增加能量消耗的作用。已有相关研究证明^[23-24], 肿瘤细胞内的脂质能通过多种途径促进癌症发展, 因此, Cel 可以利用其自身抗肿瘤和降低脂质的双重作用从而起到良好的治疗 TNBC 的疗效。

脂质体具有高度的生物相容性和生物可降解性, 是较为成熟的药物递送技术^[25]。胆固醇作为制备脂质体的常用膜材, 有实验已证明其在稳定脂质体膜中发挥了重要作用^[26]。而近年来以 Rg₃ 作为膜材的脂质体包载其他药物已有报道, 如 Zhu 等^[27]通过制备负载紫杉醇的 Rg₃ 脂质体实现了靶向肿瘤细胞和重塑肿瘤微环境的双重目的。有研究表明, Rg₃ 的修饰使脂质体在体外显著改善神经胶质瘤球体的细胞摄取和渗透, 而且在体内增强了活性神经胶质瘤靶向和瘤内扩散能力^[28]。细胞摄取实验显示, Rg₃ 脂质体能明显促进 4T1 细胞摄取, 这可能与 Rg₃ 可以分散在磷脂双分子层中, 并将其糖基暴露在脂质体表面有关; Rg₃ 与 4T1 上过表达的 Glut1 相互作用, 比胆固醇修饰的脂质体表现出了更高的捕获效率^[29-30]。根据体内外靶向性考察结果, 显示脂质体能靶向性发挥抗肿瘤作用。此外, 有研究表明, 在酸性的肿瘤微环境里, Rg₃ 会使脂质体表面带上正电荷, 并与阴离子磷脂膜形成电子对, 更利于肿瘤细胞的摄取^[31]。研究报道, Rg₃ 作为人参的主要活性成分, 具有显著抗肿瘤疗效^[28,32-33]。体内药效结果显示, 空白 Rg₃-LPs 并无明显抑制肿瘤生长的作用, 这可能与本研究中 Rg₃ 的用量较少有关。Cel/Rg₃-LPs 相较于其他组的抑瘤效果更为显著。一方面, 这可能与 Cel 的抗肿瘤活性和调脂作用有关,

另一方面还可能与 Rg₃ 赋予脂质体的主动靶向能力和延长脂质体的血液循环时间的能力有关^[34]。

综上所述, 本研究所制备的 Cel/Rg₃-LPs 安全性良好, 具有优于 Cel/Cho-LPs 的抑瘤药效, 且兼备肿瘤靶向作用, 为扩大 Cel 今后在临床抗肿瘤的应用奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Brett E, Rosemann M, Azimzadeh O, *et al.* Irradiated triple-negative breast cancer co-culture produces a less oncogenic extracellular matrix [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8265.
- [2] Liedtke C, Mazouni C, Hess K R, *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(10): 1809-1815.
- [3] Jiramongkol Y, Lam E W F. Multifaceted oncogenic role of adipocytes in the tumour microenvironment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1219: 125-142.
- [4] Fhu C W, Ali A. Fatty acid synthase: An emerging target in cancer [J]. *Molecules*, 2020, 25(17): 3935.
- [5] Luo X J, Cheng C, Tan Z Q, *et al.* Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 76.
- [6] Gong J, Lin Y Y, Zhang H Q, *et al.* Reprogramming of lipid metabolism in cancer-associated fibroblasts potentiates migration of colorectal cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 267.
- [7] Martin-Perez M, Urdiroz-Urricelqui U, Bigas C, *et al.* The role of lipids in cancer progression and metastasis [J]. *Cell Metab*, 2022, 34(11): 1675-1699.
- [8] 张丽心, 胡晓龙, 汪豪. 雷公藤红素的结构修饰及药理活性研究进展 [J]. *西北药学杂志*, 2023, 38(2): 212-222.
- [9] Kyriakou E, Schmidt S, Dodd G T, *et al.* Celastrol promotes weight loss in diet-induced obesity by inhibiting the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP in the hypothalamus [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(24): 11144-11157.
- [10] Wang C Y, Shi C F, Yang X P, *et al.* Celastrol suppresses obesity process via increasing antioxidant capacity and improving lipid metabolism [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 744: 52-58.
- [11] Gu J, Shi Y N, Zhu N, *et al.* Celastrol functions as an emerging manager of lipid metabolism: Mechanism and therapeutic potential [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164: 114981.

- [12] Zhang L X, Hu X F, Meng Q Y, *et al.* SHP2 inhibition improves celastrol-induced growth suppression of colorectal cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 929087.
- [13] Qiu N S, Liu Y, Liu Q, *et al.* Celastrol nanoemulsion induces immunogenicity and downregulates PD-L1 to boost abscopal effect in melanoma therapy [J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120604.
- [14] 司佳奇, 刘洋, 蔡佳雨, 等. 甘露糖修饰雷公藤红素脂质体处方工艺优化及体外靶向性评价 [J]. *中草药*, 2022, 53(21): 6726-6733.
- [15] Xia J X, Ma S J, Zhu X, *et al.* Versatile ginsenoside Rg₃ liposomes inhibit tumor metastasis by capturing circulating tumor cells and destroying metastatic niches [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(6): eabj1262.
- [16] 董立强, 王斌, 苏适, 等. 雷公藤红素抗肿瘤作用及机制研究进展 [J]. *生物技术进展*, 2023, 13(1): 77-82.
- [17] Gan X L, Wang F, Luo J G, *et al.* Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) based on celastrol induce multiple protein degradation for triple-negative breast cancer treatment [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2024, 192: 106624.
- [18] Riscal R, Gardner S M, Coffey N J, *et al.* Bile acid metabolism mediates cholesterol homeostasis and promotes tumorigenesis in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2024, 84(10): 1570-1582.
- [19] Zhang X, Chen Y, Li X, *et al.* Carrier-free self-assembled nanomedicine based on celastrol and galactose for targeting therapy of hepatocellular carcinoma via inducing ferroptosis [J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 267: 116183.
- [20] Zhou R S, You Y T, Zha Z Q, *et al.* Biotin decorated celastrol-loaded ZIF-8 nano-drug delivery system targeted epithelial ovarian cancer therapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 167: 115573.
- [21] Liu J L, Lee J, Salazar Hernandez M A, *et al.* Treatment of obesity with celastrol [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 999-1011.
- [22] Ma X R, Xu L Y, Alberobello A T, *et al.* Celastrol protects against obesity and metabolic dysfunction through activation of a HSF1-PGC1 α transcriptional axis [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(4): 695-708.
- [23] Li Y J, Kasim V, Yan X S, *et al.* Yin Yang 1 facilitates hepatocellular carcinoma cell lipid metabolism and tumor progression by inhibiting PGC-1 β -induced fatty acid oxidation [J]. *Theranostics*, 2019, 9(25): 7599-7615.
- [24] Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, *et al.* De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(20): 8117-8126.
- [25] Tang Y, Soroush F, Tong Z H, *et al.* Targeted multidrug delivery system to overcome chemoresistance in breast cancer [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 671-681.
- [26] Farzaneh H, Ebrahimi Nik M, Mashreghi M, *et al.* A study on the role of cholesterol and phosphatidylcholine in various features of liposomal doxorubicin: From liposomal preparation to therapy [J]. *Int J Pharm*, 2018, 551(1/2): 300-308.
- [27] Zhu Y, Wang A N, Zhang S Y, *et al.* Paclitaxel-loaded ginsenoside Rg₃ liposomes for drug-resistant cancer therapy by dual targeting of the tumor microenvironment and cancer cells [J]. *J Adv Res*, 2023, 49: 159-173.
- [28] 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.
- [29] Xia J X, Zhang S Y, Zhang R, *et al.* Targeting therapy and tumor microenvironment remodeling of triple-negative breast cancer by ginsenoside Rg₃ based liposomes [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 414.
- [30] Gallay J, de Kruijff B, Demel R A. Sterol-phospholipid interactions in model membranes. Effect of polar group substitutions in the cholesterol side-chain at C20 and C22 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 769(1): 96-104.
- [31] Selby L I, Cortez-Jugo C M, Such G K, *et al.* Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles [J]. *WIREs Nanomed Nanobi*, 2017, 9(5): e1452.
- [32] Zhao X X, Wu J C, Zhang K X, *et al.* The synthesis of a nanodrug using metal-based nanozymes conjugated with ginsenoside Rg₃ for pancreatic cancer therapy [J]. *Nanoscale Adv*, 2021, 4(1): 190-199.
- [33] Wang Y Z, Xu Q, Wu W, *et al.* Brain transport profiles of ginsenoside Rb₁ by glucose transporter 1: *In vitro* and *in vivo* [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 398.
- [34] Xia J, Chen C, Dong M, *et al.* Ginsenoside Rg₃ endows liposomes with prolonged blood circulation and reduced accelerated blood clearance [J]. *J Control Release*, 2023, 364: 23-36.

[责任编辑 郑礼胜]