

柴胡皂苷 D-大麻二酚自组装纳米粒的制备及细胞药效学评价

俞泽如¹, 张 怡¹, 于忆骅², 孙 琦³, 宋国虎¹, 余 马¹, 陈 华¹, 辛 超^{1*}

1. 西南科技大学生命科学与农林学院, 四川 绵阳 621010

2. 西南科技大学土木工程与建筑学院, 四川 绵阳 621010

3. 稻城县气象局, 四川 稻城 627750

摘要: 目的 制备柴胡皂苷 D (saikosaponins D, SSD) 与大麻二酚 (cannabidiol, CBD) 自组装纳米粒 (SSD-CBD), 并初步探究其体外抗肝癌机制。方法 采用纳米共沉淀法, 以 3 : 1 (投料质量比) 制备 SSD-CBD 自组装纳米粒, 利用 X 射线光电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)、傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 及二维核磁共振氢谱 (¹H-¹H nuclear overhauser enhancement spectroscopy, ¹H-¹H NOESY) 等多技术表征其组装机制; 通过透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)、动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 等技术评价其理化性质; 采用 MTT 法、流式细胞术 (Annexin V-FITC/PI 染色)、天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶 (cysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase) 活性测定等手段系统评价其体外抗肿瘤活性、凋亡诱导效应及初步机制。结果 该组装体通过氢键和疏水作用自组装形成, SSD 与 CBD 表现出协同效应 (CI=0.79); SSD-CBD 纳米粒还具有 pH 值响应释药特性, 在肿瘤微环境 (pH 6.8) 中特异性释药, 而在正常生理环境 (pH 7.4) 保持稳定; 机制研究表明, 其主要通过激活线粒体凋亡途径诱导 HepG2 细胞死亡。结论 构建的 SSD-CBD 自组装纳米粒, 提供了一种可同步改善 CBD 递送效率、实现精准协同给药的无载体策略, 为基于 SSD 的智能纳米药物开发提供了实验依据。

关键词: 柴胡皂苷 D; 大麻二酚; 细胞凋亡; 自组装纳米粒; 细胞药效学

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)15-5848-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.15.007

Preparation and cytopharmacology evaluation of self-assembled saikosaponin D-cannabidiol nanoparticles

YU Zeru¹, ZHANG Yi¹, YU Yihua², SUN Qi³, SONG Guohu¹, YU Ma¹, CHEN Hua¹, XIN Chao¹

1. School of Life Science and Agriculture & Forestry, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

2. School of Civil Engineering and Architecture, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

3. Daocheng County Meteorological Bureau, Daocheng 627750, China

Abstract: Objective To prepare a self-assembled nanoparticles of saikosaponin D (SSD) and cannabidiol (CBD) and preliminarily investigate their anti-hepatoma mechanism *in vitro*. **Methods** The SSD-CBD self-assembled nanoparticles were constructed using the nano co-precipitation method at a mass ratio of 3 : 1, and their assembly mechanisms were characterized by techniques including X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and ¹H-¹H nuclear overhauser enhancement spectroscopy (¹H-¹H NOESY). Its physicochemical properties were evaluated by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). The antitumor activity, apoptosis induction, and preliminary mechanisms were systematically assessed by MTT assay, flow cytometry (Annexin V-FITC/PI staining), and cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase) activity assays. **Results** The assembly was self-assembled through hydrogen bonding and hydrophobic interactions, with SSD and CBD showing a synergistic effect against HepG2 cells (CI = 0.79). It exhibited pH-responsive drug release, specifically releasing drugs in the tumor microenvironment (pH 6.8) while remaining stable at normal physiological environment (pH 7.4). Mechanistic studies indicated that

收稿日期: 2026-01-23

基金项目: 西藏自治区重点研发计划 (XZ202401ZY0020); 药用植物种质资源库建设 (2021-I2M-1-032); 国家岗位产业体系专家项目 (CARS-21); 四川省区域创新合作项目 (2026YFHZ0163)

作者简介: 俞泽如, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源与分子生物学研究。E-mail: YY2953457139@126.com

*通信作者: 辛 超, 副教授, 硕士研究生导师, 从事天然产物化学与药物递送研究。E-mail: XINC@swust.edu.cn

it primarily induced HepG2 cell death by activating the mitochondrial apoptotic pathway. **Conclusion** The constructed SSD-CBD self-assembled nanoparticles offer a carrier-free strategy that can simultaneously improve the delivery efficiency of CBD and achieve precise collaborative drug delivery, providing an experimental basis for the development of intelligent nanomedicine based on SSD.

Key words: saikosaponin D; cannabidiol; apoptosis; self-assembled nanoparticles; cytopharmacology

柴胡皂苷 D (saikosaponin D, SSD) 是柴胡的关键活性成分, 具有明确的抗肿瘤^[1-2]活性。与许多天然产物类似, 其单药抗肿瘤效力有限, 制约了临床应用; 而其良好的水溶性, 则为制剂设计提供了优势。大麻二酚 (cannabidiol, CBD) 是另一种备受关注的天然抗肿瘤成分, 研究表明, 其可通过作用于多条信号通路抑制肿瘤进展^[3], 展现出多靶点治疗的潜力, 但极高的脂溶性与不稳定性也导致了严峻的体内递送难题与较低的生物利用度^[3]。SSD 与 CBD 在理化性质与作用机制上具互补性, 将二者联合, 有望同时实现协同增效与克服各自的递送瓶颈, 其关键在于构建能同步递送并控制释放的剂型系统。近年来, 基于分子自组装的“无载体”纳米药物策略为该挑战提供了解决方案^[4]。

为探寻 SSD 的高效配伍方案, 本研究选取了与 SSD 结构高度同源的柴胡皂苷 A (saikosaponin A, SSA)^[5]、具多靶点抗氧化活性的槲皮素^[6]以及具多通路抑瘤潜力的 CBD^[7]进行初步筛选, 以考察结构相似性、作用机制差异等对协同效应的影响。结果显示, SSD 与 CBD 的组合最具协同潜力, 其协同作用源于生物学功能与化学结构层面的双重互补。在生物学层面, 文献提示二者可在抗肿瘤及凋亡调节等关键通路上发挥互补效应^[8]; 在化学结构层面, SSD 的两亲性结构与 CBD 的疏水骨架及酚羟基之间亦存在天然的分子互补性。这种结构互补性不仅为二者通过氢键、疏水作用等实现分子共组装提供了直接驱动力, 也为后续构建可响应肿瘤微环境 pH 值变化的智能递送系统奠定了理论基础。

近年来, 纳米技术在改善药物递送方面优势显著。其中, 基于分子自组装的无载体策略备受关注, 它直接利用药物分子自身的理化性质及相互间的非共价作用, 驱动其自发组装为结构完整的纳米实体^[9-10]。这种“自递送”模式不仅能有效改善难溶性药物的分散性 (如研究已通过构建 CBD 纳米胶束证实其可行性^[7]), 更重要的是, 可将联合用药的多种成分整合于单一纳米结构内部, 为实现药物的共定位递送与比例可控的协同治疗提供了可能。本研究据此构建 SSD-CBD 自组装纳米粒, 以期实现药物的精准共递送与协同抗肿瘤效应。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Zetasizer Nano ZS 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; HT7800 型透射电子显微镜, 日本日立公司; Nicolet iS20 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国赛默飞世尔科技公司; Avance NEO 500 MHz 型核磁共振波谱仪, 德国布鲁克公司; SH-1000 型酶标仪, 天美仪拓实验室设备有限公司; K-Alpha 型 X 射线光电子能谱仪, 美国赛默飞世尔科技公司; LSM-900 型共聚焦荧光显微镜, 卡尔蔡司光学有限公司; LongCyte C3140 型流式细胞仪, 北京层浪生物科技有限公司; Amicon Ultra-2 超滤离心管, 膜截留相对分子质量 (molecular weight cut-off, M_w) 为 30 000, 美国 Millipore 公司; 湘仪 H2500R 型高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.2 药品与试剂

槲皮素, 批号 AZ21101653, 质量分数 $\geq 98.0\%$, 购自成都埃法生物科技有限公司; SSA (批号 DSTDC000601)、SSD (批号 DSTDC000802), 质量分数 $\geq 98.0\%$, 购自成都乐美天医药科技有限公司; CBD, 批号 FE10071912, 质量分数 $\geq 98.0\%$, 购自美国 Cerilliant 公司。

DMEM 高糖培养基, 批号 3251148, 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 货号 11012-8611, 购自浙江天杭生物科技股份有限公司; 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (货号 T1300)、青霉素-链霉素溶液 (货号 P1400), 均购自北京索莱宝科技有限公司; MTT, 批号 1334GR001, 购自广州赛国生物科技股份有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (货号 C1056)、天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶 (cysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase) 3/8/9 活性检测试剂盒 (货号 C1118/C1155/C1161)、活性氧检测试剂盒 (货号 S0034)、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1, 货号 C2001S) 均购自上海碧云天生物科技股份有限公司; 腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 含量测定试剂盒, 货号 A095-1-1, 购自南京建成生物工程研究所有限公司。

程序性细胞死亡抑制剂包括凋亡抑制剂 (Z-VAD-FMK, 货号 C1202)、坏死抑制剂 (Necrostatin-1, 货号 SC4359)、焦亡抑制剂 (双硫伦, 货号 T819460)、自噬抑制剂 (3-甲基腺嘌呤, 货号 M833793)、铁死亡抑制剂 (Ferrostatin-1, 货号 F864515) 和铜死亡抑制剂 (四硫钼酸铵, 货号 A828261) 均购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.3 细胞系

试验所用人肝癌细胞 HepG2, 购自上海碧云天生物技术有限公司, 产品编号 C6346, 由本实验室保存并传代。

2 方法与结果

2.1 HepG2 细胞培养与处理

HepG2 细胞于含 10% FBS 及 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 完全培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下常规培养。实验均采用对数生长期细胞。待测药物 (SSD、CBD、SSA、槲皮素) 及其物理混合物均以磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 新鲜配制, 确保溶剂 DMSO 的终体积分数不大于 0.5%。以含等量 DMSO (体积分数 0.5%) 的 PBS 作为溶剂对照组。

2.2 SSD-CBD 自组装纳米粒的制备、最优配比及基本性质表征

2.2.1 SSD-CBD 自组装纳米粒的制备和最优配比的确定 采用共沉淀法制备 SSD-CBD 自组装纳米粒。首先, 将 SSD 与 CBD 按照 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1 的质量比, 分别溶解于 DMSO 中, 配制成 10 mg/mL 的溶液, 超声处理 5 min 使其充分溶解。在室温、500 r/min 磁力搅拌条件下, 将 CBD 溶液溶于 5 mL DMSO (有机相) 中, 使有机相初始占比为 10%, 随后以 1 mL/min 的速率逐滴加入 SSD 溶液, 室温持续搅拌 1 h。将混合溶液移入截留相对分子质量为 1000 的透析袋, 用去离子水透析 48 h, 期间每 12 小时更换 1 次透析液, 以彻底去除未结合单体及有机溶剂。收集透析袋内悬浮液, 冷冻干燥, 获得 SSD-CBD 自组装纳米粒粉末。

通过 MTT 法检测发现, 当 SSD 与 CBD 投料比为 3:1 时, 所制备的纳米粒在 5.0~10.0 µg/mL 质量浓度范围内对 HepG2 细胞的生长抑制活性最强, 故确定此为最佳制备配比。

2.2.2 基本性质表征 为精确评价该配比下纳米粒的药剂学性能, 载药量与包封率测定参照超滤离心-有机溶剂破乳结合 HPLC 法^[11], 以超滤离心管

分离游离药, 乙腈破乳后 HPLC 分别测定游离药与总药质量浓度。在无载体共组装体系中, SSD 与 CBD 既互为药物也互为载体材料。

为明确表征, 本研究以 CBD 作为计算基准, 载药量与包封率计算公式如下。经测定, 此最优配比 (SSD 与 CBD 投料比为 3:1) 纳米粒的载药量为 (91.2±3.5)%, 包封率为 (88.5±4.1)%。对此最优配比 (SSD 与 CBD 投料比为 3:1) 纳米粒的理化性质进行表征, 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)^[12] 观察下, 纳米粒呈类球形, 形态规则, 干燥状态下的核心尺寸约为 30 nm (图 1)。动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 法测定其水合粒径为 (110.1±5.7) nm, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.234±0.056, 表明粒径分布均匀 (图 2)。ζ 电位测定结果 (图 3) 为 (-15.9±2.2) mV, 适度的负电荷有利于体系稳定。

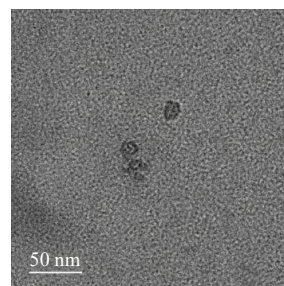


图 1 TEM 下自组装纳米粒的形貌图

Fig. 1 TEM image of self-assembled nanoparticles

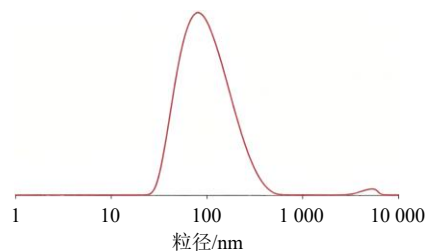


图 2 DLS 测定的自组装纳米粒水合粒径分布

Fig. 2 Hydrated particle size distribution of self-assembled nanoparticles determined by DLS

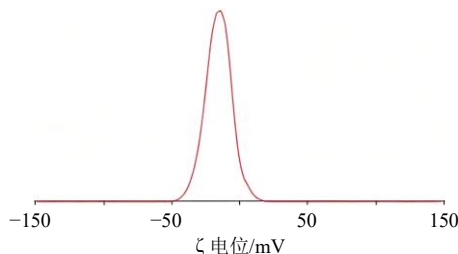


图 3 激光多普勒电泳法测定的自组装纳米粒 ζ 电位分布

Fig. 3 ζ potential distribution of self-assembled nanoparticles determined by laser Doppler electrophoresis

$$\text{载药量} = m_{\text{CBD}} / M_{\text{总}}$$

$$\text{封装率} = m_{\text{CBD}} / M_{\text{投}}$$

m_{CBD} 为纳米粒中包载的 CBD 质量, $M_{\text{总}}$ 为 SSD-CBD 自组装纳米粒的总质量, $M_{\text{投}}$ 为投料中 CBD 的总质量

2.3 与 SSD 协同配伍成分的筛选与验证

采用 MTT 法评估 SSD 分别与 SSA、槲皮素及 CBD 的物理混合物对 HepG2 细胞的毒性, 以筛选最佳配伍成分。物理混合物均按 SSD 与 CBD 质量比为 3:1 制备, 即精密称取 2 原料药, 分别以少量无水乙醇溶解制得母液, 按质量比 3:1 混合后, 以 DMEM 完全培养基逐级稀释至所需给药浓度, 终体积分数乙醇 $\leq 0.1\%$, 涡旋 30 s 混匀, 即得。

同步设溶剂对照孔 (含同终体积分数乙醇, 不加药)。将对数生长期的 HepG2 细胞经胰酶消化后, 以每孔 6 000 个的密度接种于 96 孔板中, 边缘孔以 PBS 填充。于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h 使细胞充分贴壁后, 吸弃原培养基, 每孔加入含不同质量浓度梯度药物的新鲜培养基 100 μL , 继续培养 48 h。随后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5.0 mg/mL), 避光孵育 4 h。小心吸弃上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 于摇床上避光振荡 10 min 至甲瓚结晶完全溶解。使用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔的吸光度 (A) 值, 实验孔、空白孔、对照孔的 A 值分别记为 $A_{\text{实验}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 。细胞存活率^[13]计算公式如下。结果如表 1 所示, 在质量浓度 5.0~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 所有处理组均呈现质量浓度相关性的细胞生长抑制。其中, SSD 与 CBD 的物理混合物在所有测试质量浓度下, 均表现出最强的抑制效果。

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

表 1 不同药物及其与 SSD 的组合对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effects of different drugs and their combinations with SSD on viability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

样品	细胞存活率/%				
	0	5.0	10.0	15.0	20.0
	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
SSA	100 $\pm$ 2	93 $\pm$ 2	90 $\pm$ 3	60 $\pm$ 3	5 $\pm$ 1
SSD	100 $\pm$ 4	95 $\pm$ 9	89 $\pm$ 6	23 $\pm$ 3	6 $\pm$ 2
槲皮素	100 $\pm$ 2	97 $\pm$ 3	96 $\pm$ 2	94 $\pm$ 4	92 $\pm$ 4
CBD	100 $\pm$ 5	99 $\pm$ 7	79 $\pm$ 4	26 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1
SSD+SSA 物理混合物	100 $\pm$ 3	94 $\pm$ 2	90 $\pm$ 2	62 $\pm$ 3	5 $\pm$ 1
SSD+槲皮素物理混合物	100 $\pm$ 3	99 $\pm$ 2	90 $\pm$ 3	76 $\pm$ 3	67 $\pm$ 3
SSD+CBD 物理混合物	100 $\pm$ 2	99 $\pm$ 4	77 $\pm$ 4	7 $\pm$ 2	3 $\pm$ 0
SSD-CBD 自组装纳米粒	100 $\pm$ 3	90 $\pm$ 4	15 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1

基于上述筛选结果, 进一步通过量-效曲线分析了 SSD、CBD、二者物理混合物及其自组装纳米粒的协同作用。结果如表 1 所示, 在质量浓度 10.0、15.0 $\mu\text{g/mL}$ 下, SSD-CBD 自组装纳米粒的细胞存活率 (分别为 15% 和 4%) 较同质量浓度下的物理混合物 (7%~90%) 有大幅降低, 表明自组装后药物可进一步增强药效。即使在质量浓度 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 下, 自组装纳米粒也保持了与物理混合物相近的极低存活率 (3%)。结果初步表明, 自组装策略能够有效提高药物对 HepG2 细胞的抑制作用。

经拟合计算, SSD、CBD、物理混合物及 SSD-CBD 自组装纳米粒的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 (13.01 $\pm$ 1.05)、(12.80 $\pm$ 0.98)、(11.14 $\pm$ 0.87) 及 (8.92 $\pm$ 0.75) $\mu\text{g/mL}$ 。根据 Chou-Talalay 中效原理^[14]计算得 SSD 与 CBD 物理混合物的协同指数 (combination index, CI) 为 0.79 (小于 1, 属协同作用), 确证二者存在明确的协同抗肿瘤作用。故本研究选定 CBD 作为与 SSD 进行共自组装的最佳配伍药物。

$$CI = D_{\text{SSD}} / D_{50\text{SSD}} + D_{\text{CBD}} / D_{50\text{CBD}} + D_{\text{SSD}} D_{\text{CBD}} / D_{50\text{SSD}} D_{50\text{CBD}}$$

D_{SSD} 与 D_{CBD} 为混合物达到 IC₅₀ 时各单药的质量浓度, $D_{50\text{SSD}}$ 与 $D_{50\text{CBD}}$ 分别为各单药单独作用时的 IC₅₀^[15]

IC₅₀ 值采用 GraphPad Prism 9.0 软件, 以药物质量浓度的对数为横坐标、细胞存活率为纵坐标, 通过四参数 Logistic 非线性回归拟合获得。

2.4 SSD-CBD 自组装纳米粒的体外释药行为

采用透析法, 以 SSD 和 CBD 的释放量为指标, 考察了纳米粒在不同介质中的体外释药行为。结果如图 4 所示, 该纳米粒在模拟肿瘤微环境 (pH 6.8) 的 PBS 缓冲液中, 表现出持续的 pH 值响应性释药, 48 h 时 SSD 与 CBD 的累积释药率分别为 50.6% 和 52.1%, 两者释放行为基本同步。在 12 h 时纳米粒的累积释药率已达 25.98%, 表明其具有快速起效的潜力。与此相反, 在正常生理环境 (pH 7.4) 和含 10% FBS 的溶液中, 纳米粒在 48 h 监测期内始终高度稳定, 累积释药率极低 (小于 5%), 表明其在模拟体循环中结构稳定, 可有效防止药物提前泄漏。

值得注意的是, 在 pH 5.0 条件下累积释药率也较低, 这与过低的 pH 值影响了组装体解离的动力学平衡有关^[16]。该机制阐明, SSD-CBD 自组装纳米粒可实现“正常组织稳定、肿瘤部位释药”的精准递送, 其采用的无载体共组装策略, 也与构建刺激响应性纳米药物的先进设计思路一脉相承^[4], 证实

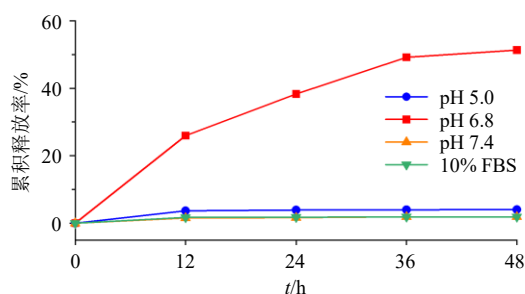


图 4 SSD-CBD 自组装纳米粒的体外释药行为分析
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 *In vitro* drug release behavior analysis of SSD-CBD self-assembled nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

策略的合理性与普适性。

2.5 SSD-CBD 自组装纳米粒诱导 HepG2 细胞死亡方式的鉴定

为阐明其诱导细胞死亡的主要途径，基于经典程序性死亡通路抑制策略^[17]，采用了一系列特异性抑制剂进行研究。细胞经各抑制剂预处理后，与 SSD-CBD 缀合物共培养，通过检测细胞存活率的变化，评估相应通路的阻断效果，结果如表 2 所示。在凋亡抑制剂的保护下，细胞存活率最高，达到 $(72.16 \pm 5.85)\%$ ，显著高于其他处理组 ($P < 0.001$)，表明阻断 Caspase 相关性凋亡途径能有效逆转 SSD-CBD 自组装纳米粒的细胞毒性。相反，坏死抑制剂的细胞存活率仅为 $(23.53 \pm 5.17)\%$ 。值得注意的是，铜死亡抑制剂、铁死亡抑制剂、焦亡抑制剂、自噬抑制剂处理组的细胞存活率极低，分别为 $(11.00 \pm 2.65)\%$ 、 $(6.94 \pm 1.25)\%$ 、 $(6.80 \pm 1.52)\%$ 和 $(6.19 \pm 0.84)\%$ 。该结果显示，SSD-CBD 自组装纳米粒主要通过激活 Caspase 依赖性凋亡途径诱导 HepG2 细胞死亡。

2.6 SSD-CBD 自组装纳米粒的协同抗肿瘤药效及机制研究

2.6.1 细胞摄取行为 为评估 SSD-CBD 自组装纳

表 2 SSD-CBD 自组装纳米粒诱导 HepG2 细胞死亡方式
($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Patterns of HepG2 cell death induced by SSD-CBD self-assembled nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=6$)			
抑制剂类型	细胞存活率/%	抑制剂类型	细胞存活率/%
PBS (对照)	100.00 ± 4.98	凋亡抑制剂	72.16 ± 5.85***
自噬抑制剂	6.19 ± 0.84****	坏死抑制剂	23.53 ± 5.17****
焦亡抑制剂	6.80 ± 1.52****	铜死亡抑制剂	11.00 ± 2.65****
铁死亡抑制剂	6.94 ± 1.25****		

与 PBS 组比较：*** $P < 0.001$ ；与凋亡抑制剂组比较：**** $P < 0.001$ 。
*** $P < 0.001$ vs PBS group; **** $P < 0.001$ vs apoptosis inhibitor group.

米粒在肿瘤细胞中的摄取与内化能力，本研究采用 FITC 荧光染料进行标记，具体操作参照针对含羟基化合物的标记方法^[18]，并通过共聚焦显微镜观察其在 HepG2 细胞内的分布动态。结果如图 5 所示，HepG2 细胞对 FITC 标记的 SSD-CBD 自组装纳米粒的摄取呈现显著的时间相关性。其中，SSD-CBD 列显示药物在胞内的分布与蓄积，DAPI 为细胞核染色，Bright 为细胞明场形态，Merge 为叠加图像，直观表明纳米粒主要分布于细胞质及核周区域。共孵育 30 min 后，绿色荧光信号主要定位于细胞膜表面；随着孵育时间延长至 12 h，荧光逐渐向细胞质内扩散，信号强度明显增强；至 24 h，胞质内呈现弥漫性强荧光，表明纳米粒已被细胞高效内吞并在胞内蓄积。该结果提示自组装纳米粒具有良好的细胞亲和性与内化效率。

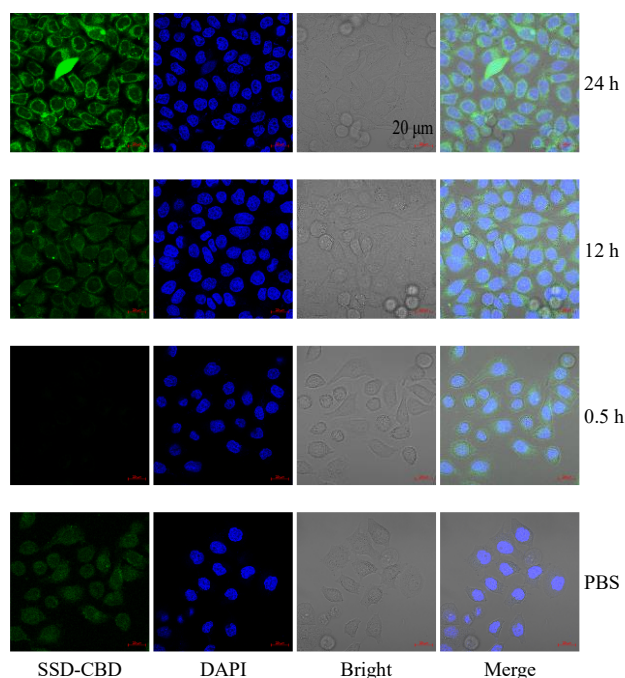


图 5 FITC 标记的 SSD-CBD 自组装纳米粒在 HepG2 细胞中的摄取

Fig. 5 Cellular uptake of FITC-labeled SSD-CBD nanoparticles in HepG2 cells

2.6.2 细胞凋亡率检测 为定量评价 SSD-CBD 自组装纳米粒诱导 HepG2 细胞凋亡的效果，本研究采用 Annexin V-FITC/PI 双染法^[19]，通过流式细胞术进行分析，结果见图 6。其中，横坐标 (FITC) 为 Annexin V-FITC 荧光强度，用于标记暴露于细胞膜外表面的磷脂酰丝氨酸，指示早期凋亡细胞；纵坐标 (PI) 为碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 荧光强度，主要用于检测细胞死活 (膜完整性) 或分析细

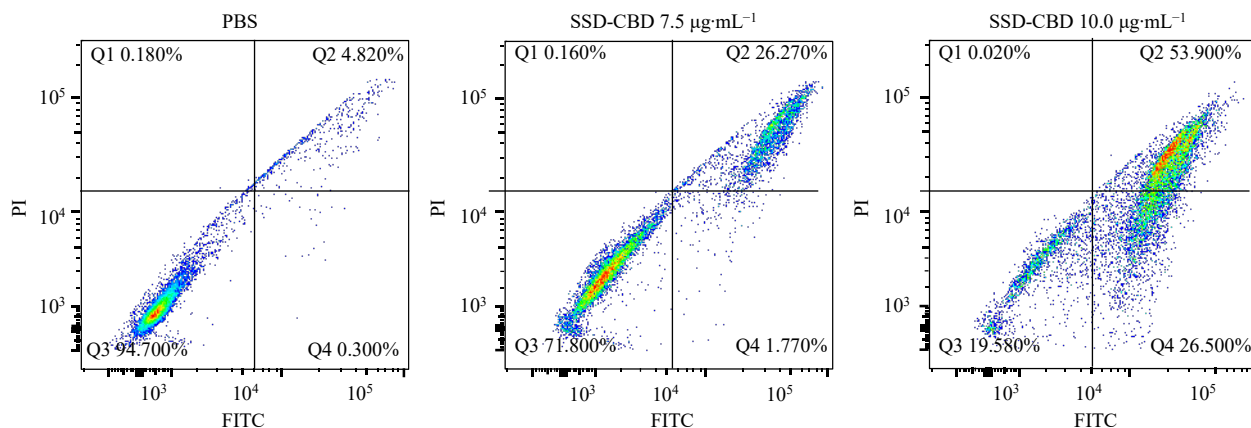


图 6 经 SSD-CBD 24 h 处理后 HepG2 细胞的凋亡分析 (流式细胞术)

Fig. 6 Apoptosis analysis of HepG2 cells treated for SSD-CBD 24 h (flow cytometry)

胞周期。图中 4 个象限分别表示: Q1 (PI⁺/FITC⁻, 坏死细胞), Q2 (PI⁺/FITC⁺, 晚期凋亡细胞), Q3 (PI⁻/FITC⁻, 健康活细胞), Q4 (PI⁻/FITC⁺, 早期凋亡细胞)。结果表明 SSD-CBD 自组装纳米粒可质量浓度相关性地诱导 HepG2 细胞凋亡。与对照组相比, 7.5、10.0 µg/mL 纳米粒处理 24 h 后总凋亡率 (Q2+Q4) 分别从 5.120% 显著上升至 28.040% 和 80.400%。

2.6.3 Caspase 蛋白酶活性、线粒体功能及细胞内活性氧和 ATP 水平检测 为深入探究 SSD-CBD 自组装纳米粒诱导细胞凋亡的机制, 本研究检测了凋亡执行蛋白 Caspase 的活性、线粒体功能、细胞内活性氧及 ATP 水平。结果如表 3 所示, 经 SSD-CBD 自组装纳米粒处理 24 h 后, Caspase-3/8/9 的活性均呈现质量浓度相关性升高。在 10.0 µg/mL 质量浓度下, 3 种 Caspase 的活性分别为对照组的 4.9 倍、5.8

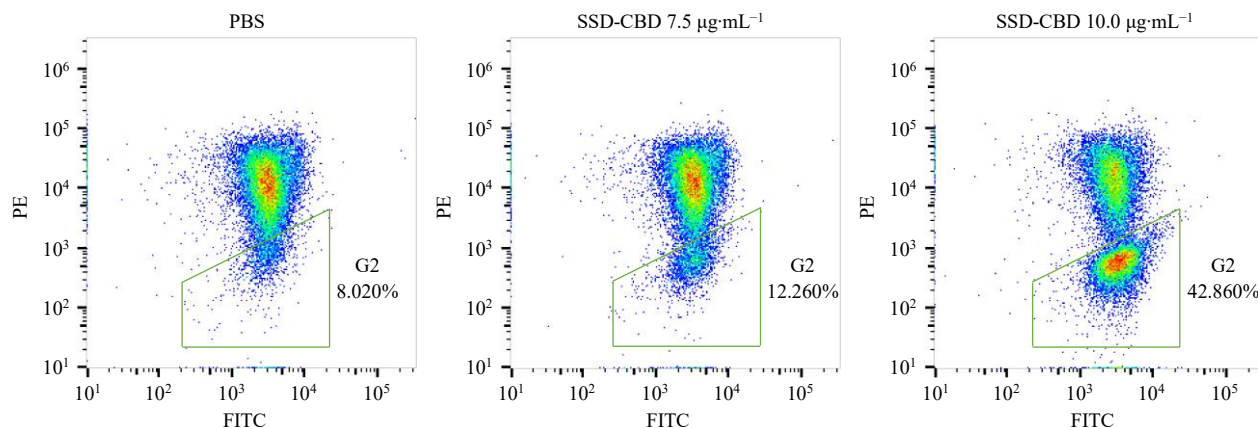
表 3 SSD-CBD 自组装纳米粒对 HepG2 细胞 Caspase 活性及 ATP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of SSD-CBD nanoparticles on Caspase activity and ATP levels in HepG2 Cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ (µg·mL ⁻¹)	活性/(nmol pNA·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)			ATP 含量/ (pmol·cells ⁻¹)
		Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9	
PBS (对照)	-	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	176.0 ± 25.0
SSD-CBD	6.0	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.01	146.0 ± 25.0
	7.5	-	-	-	78.0 ± 15.0
	10.0	0.54 ± 0.04	0.64 ± 0.07	0.60 ± 0.05	35.0 ± 4.0

倍和 6.0 倍, 提示死亡受体途径与线粒体途径均被激活^[20]。

JC-1 染色流式细胞术分析进一步证实, 纳米粒处理能浓度相关性地导致线粒体膜电位下降。结果如图 7 所示, 在 PBS 对照组中, 线粒体膜电位下降 (去极化) 的细胞比例为 8.020%; 经 7.5、10.0 µg/mL



图中 G2 门内百分比表示线粒体膜电位下降的细胞比例。

The percentage within the G2 gate indicates the proportion of cells with decreased mitochondrial membrane potential.

图 7 不同质量浓度 SSD-CBD 自组装纳米粒处理 24 h 后 HepG2 细胞的线粒体膜电位 JC-1 染色流式细胞术分析

Fig. 7 JC-1 staining-based flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential in HepG2 cells following 24 h treatment with different concentrations of SSD-CBD nanoparticles

SSD-CBD 自组装纳米粒处理 24 h 后, 该比例分别上升至 12.260% 和 42.860%, 表明线粒体功能显著受损^[21]。与此同时, 细胞内 ATP 含量随纳米粒质量浓度增加而显著耗竭, 结果如表 3 所示, 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 处理组的 ATP 含量降至 (35.0 ± 4.0) pmol/cells, 仅为对照组的 19.9%, 表明细胞能量代谢被严重破坏。

此外, 如表 4 所示, SSD-CBD 自组装纳米粒可极强烈地诱导细胞内活性氧生成, 其荧光强度远超 SSD 或 CBD 单药处理组, 提示其可引发强烈的氧化应激^[22]。这些结果共同表明, SSD-CBD 自组装纳米粒通过诱导线粒体损伤、引发氧化应激及能量危机, 从而激活了内源性凋亡通路^[23]。

2.7 SSD 与 CBD 分子间相互作用力的表征

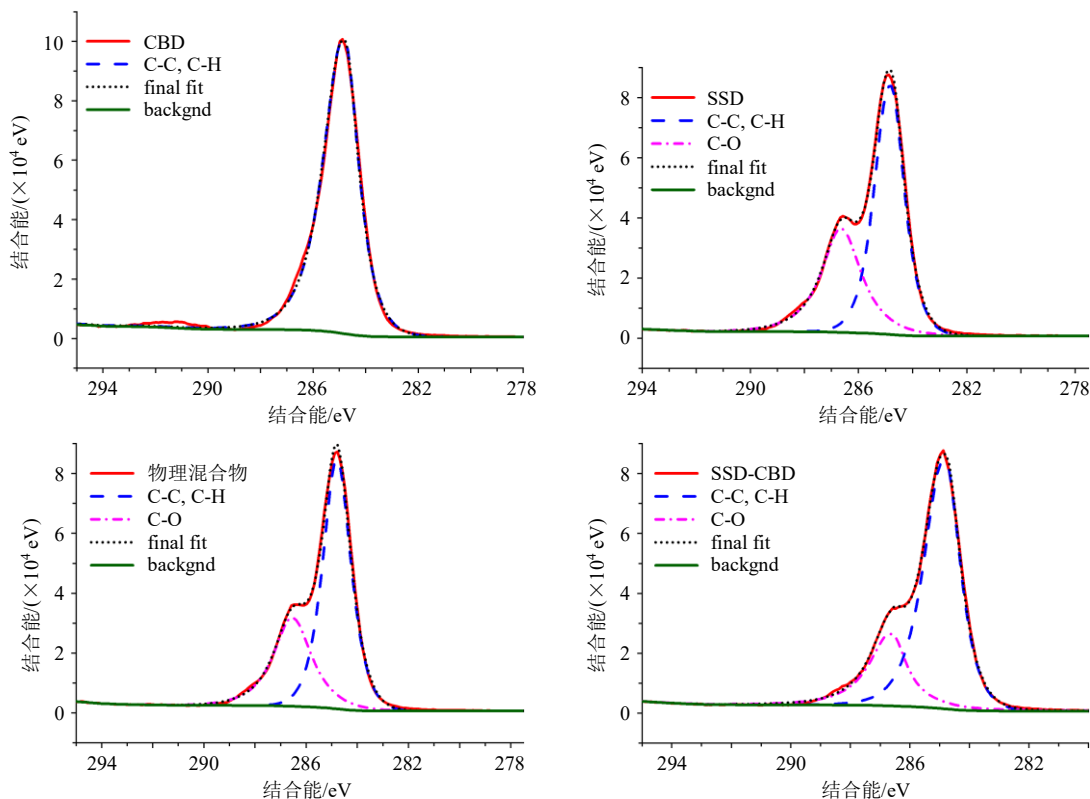
为阐明 SSD-CBD 自组装纳米粒的分子组装机理, 采用多谱学技术对 SSD、CBD 单体、其物理混合物及最终形成的 SSD-CBD 自组装纳米粒进行了

表 4 不同药物处理对 HepG2 细胞内活性氧水平的影响

Table 4 Effects of different drug treatments on intracellular reactive oxygen species levels in HepG2 Cells

处理组	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	活性氧荧光强度/RFU
PBS (对照)	—	824.127 ± 117.261
SSD	6.0	$2\,996.307 \pm 248.773$
CBD	7.5	$2\,818.630 \pm 225.422$
SSD-CBD	10.0	$9\,856.358 \pm 538.198$

系统表征与对比分析。X 射线光电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 分析结果 (图 8) 显示, 相较于单体和物理混合物, SSD-CBD 自组装纳米粒中 C 1s 轨道的结合能发生显著变化。通过对 C 1s 谱图进行分峰拟合, 发现归属于 CBD 特征组分的子峰发生位移, 表明在纳米粒中 CBD 的化学微环境发生改变, 提示其与 SSD 之间形成了密切的相互作用。



图中不同线代表处理后的谱图数据。实线 (Final Fit) 为最终拟合曲线; 长虚线 (Backgnd) 为扣除的背景信号; 短虚线、点划线与双点划线分别为峰拟合技术得到的子峰, 可分别归属为特定组分及 C-C/C-O/C-H 化学键。

The lines represent the spectral data after processing. The solid line (Final Fit) is the final fitting curve; the long-dashed line (Backgnd) is the background signal after subtraction; the short-dashed, dotted, and dash-dotted lines represent the sub-peaks obtained from peak fitting techniques.

图 8 C 1s 轨道 XPS 谱图及分峰拟合

Fig. 8 C 1s orbital XPS spectrum and peak fitting

傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 为分子间氢键的形成提供了直接证据 (图 9)。在 $4\,000 \sim 3\,500 \text{ cm}^{-1}$, 归属于 SSD

分子中糖基羟基与 CBD 分子中酚羟基的 O-H 伸缩振动宽吸收峰, 在 SSD-CBD 自组装纳米粒谱图中相较于各单体及物理混合物, 发生了明显的红移与

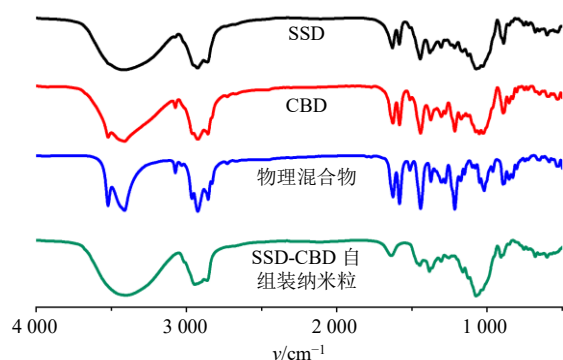


图9 FTIR 图

Fig. 9 FTIR spectra

峰形宽化。此现象是分子间氢键形成的典型特征，提示 SSD 分子中的糖基羟基与 CBD 分子中的酚羟基之间形成了稳定的氢键网络，这是驱动分子自组装的关键作用力之一。

核磁共振波谱 (^1H - ^1H nuclear overhauser enhancement spectroscopy, ^1H - ^1H NOESY 谱图) 分析证实了 SSD 与 CBD 之间的分子间相互作用。结果如图 10 所示, SSD-CBD 自组装纳米粒的谱图中出现了多个在单体和物理混合物中未观测到的特征交叉峰, 包括 (δ 8.66、4.27)、(δ 8.66、4.44) 及 (δ 8.66、4.97) 等, 其中, $\delta \approx 4.27 \sim 4.97$ 的信号归

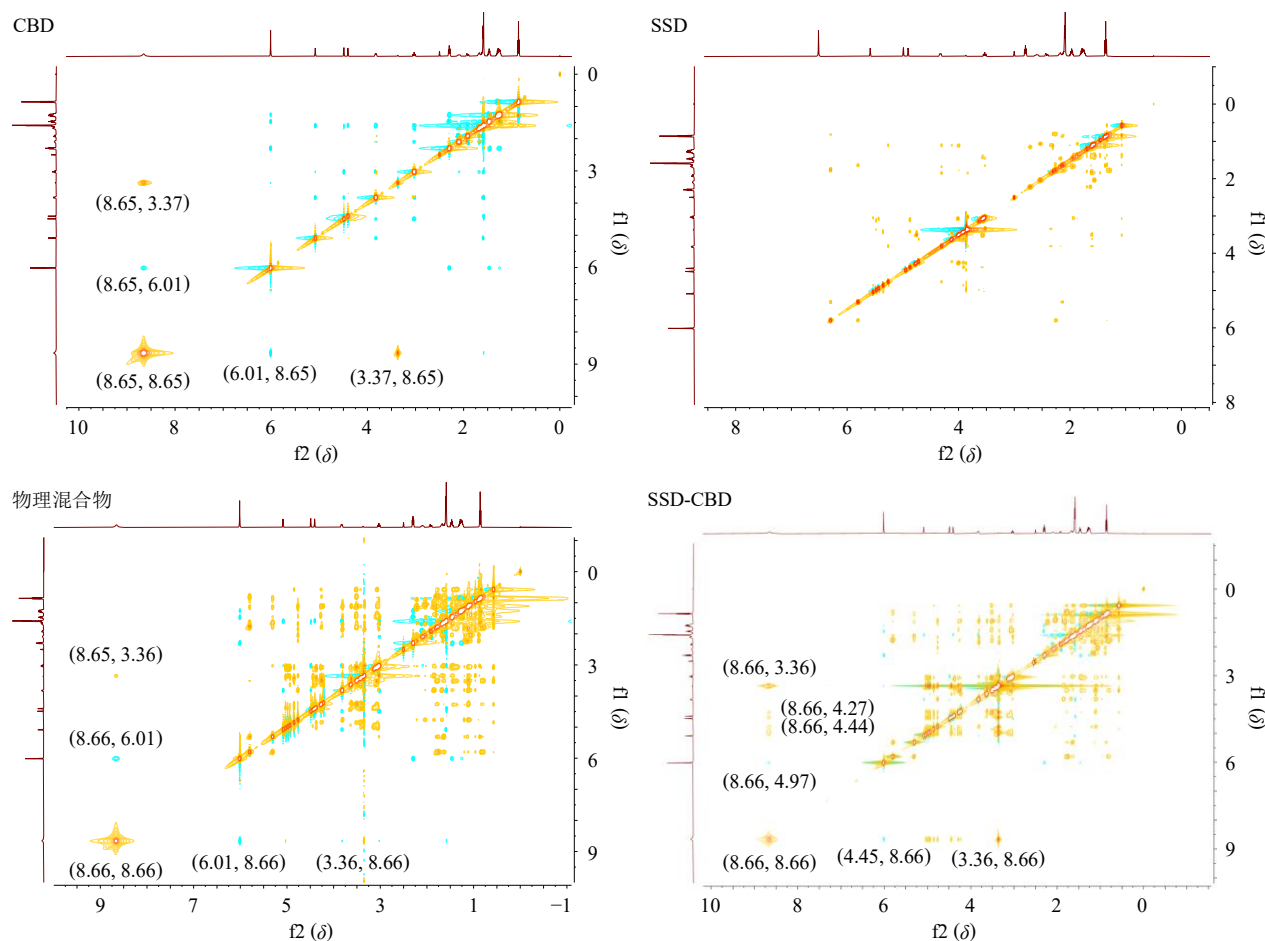


图 10 ^1H - ^1H NOESY 谱图 (600 MHz, DMSO- d_6 , 298 K)

Fig. 10 ^1H - ^1H NOESY spectra (600 MHz, DMSO- d_6 , 298 K)

属于 CBD 的羟基质子或其邻近烷基质子, δ 8.66 处的信号则归属为 SSD 糖基质子。这些交叉峰表明, 在组装体中 CBD 的羟基、烷基区域与 SSD 的糖基质子之间存在稳定的空间接近, 这是定向氢键作用形成的直接谱学证据^[24]。同时, 谱图中 (δ 4.45、8.66) 及 (δ 3.36、8.66) 等区域也观察到交叉峰, 结合 ^1H 谱中疏水区 ($\delta \approx 1.0 \sim 2.0$) 信号的增强与宽

化, 共同证实了疏水相互作用驱动分子聚集。综上, NOESY 与 ^1H 谱数据表明, 氢键与疏水相互作用共同驱动了 SSD 与 CBD 的分子自组装。

紫外-可见吸收光谱 (ultraviolet-visible absorption spectrum, UV-Vis) 分析表明, 组装过程中可能存在电子相互作用 (图 11)。SSD-CBD 自组装纳米粒在约 270 nm 处出现了 1 个新的吸收峰, 而该峰在单体

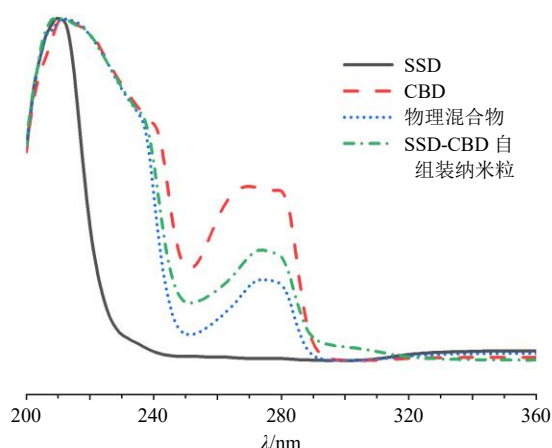
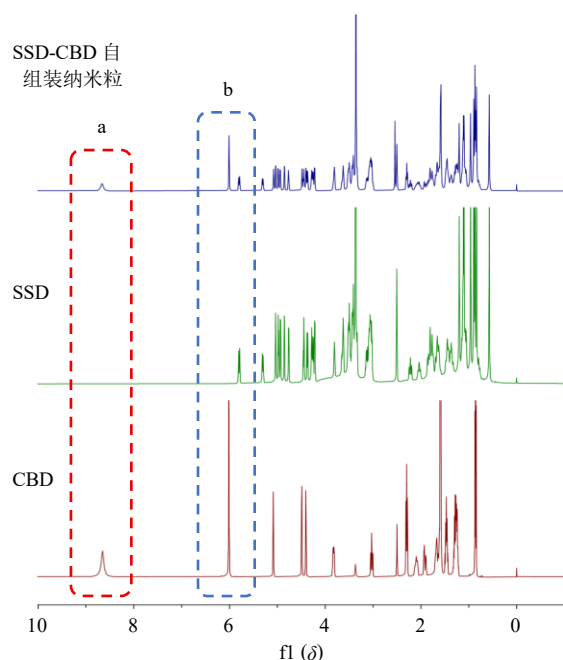


图 11 UV-Vis 图

Fig. 11 UV-Vis spectra

及其物理混合物的谱图中,未观察到或者强度极低,提示在纳米粒形成过程中,分子间可能发生了电子耦合或共轭体系扩展(如电荷转移或 π - π 堆积等相互作用^[25])。这一现象可能与组装体的形成和稳定相关。此外,对比¹H-NMR谱图(图12)可见,形成SSD-CBD自组装纳米粒后,SSD和CBD的部分特征质子峰形发生明显变化。如图中区域a($\delta \approx 8.0 \sim 9.5$)和区域b($\delta \approx 5.5 \sim 7.0$)所示,CBD芳香区及烯氢区的质子信号均向低场移动且峰形变宽,提示SSD与CBD分子间发生了强烈的相互作用。进一步排除了简单物理混合的可能性,而是形成了具有新结构的组装体。

图 12 ¹H-NMR 谱Fig. 12 ¹H-NMR spectra

多谱学表征结果共同证实,SSD与CBD分子主要通过分子间氢键、疏水相互作用驱动自组装,形成结构稳定的SSD-CBD自组装纳米粒。

3 讨论

体外实验确证了SSD与CBD的协同抗肿瘤潜力(CI=0.79)。而SSD与SSA或槲皮素的组合效果有限^[26-27]。基于分子间的互补性^[8],本研究通过共沉淀法成功驱动二者自组装形成结构均一的纳米粒,实现了从“药物协同”到“剂型协同”的转变^[28]。该“无载体”共组装策略^[4]将药物以最佳比例(3:1)整合于同一纳米粒,不仅为细胞内实现协同效应奠定了基础,其高达91.2%的载药量,较UA-MTX等无载体体系^[29]显著提升,进一步强化了协同效率。该组装体在胞内的具体共定位行为与时空协同作用机制,未来可借助双荧光标记等示踪技术进行直接观测与验证。

本纳米粒的协同效应源于结构和功能的一体化设计。动态氢键网络赋予pH值响应性^[30],使其在正常生理环境(pH 7.4)中保持稳定,而在肿瘤微环境(pH 6.8)中可特异性快速释药,从而在药剂学层面实现微环境触发的智能释药^[31]。机制上,纳米粒主要通过激活Caspase依赖性凋亡通路发挥抗肿瘤作用,Caspase-8与Caspase-9的同时显著激活提示死亡受体途径与线粒体途径均被启动。其协同机制可能是SSD与CBD协同作用于线粒体。其中,SSD可诱导线粒体损伤,而CBD则可能通过影响线粒体通道干扰钙稳态^[32],二者共同加剧氧化应激与能量危机,从而协同放大下游的凋亡级联反应,这种多通路干预的模式可能有助于克服肿瘤耐药^[33]。其精确的分子靶点与信号通路网络,有待通过蛋白质印迹等技术蛋白水平上进一步验证^[34-35]。

本策略将活性成分自身转化为递送系统,从源头上解决了脂质体或聚合物胶束^[36]在载药量与生物相容性上的矛盾。相较于依赖复杂生物偶联的抗体-药物偶联物^[37],其基于内置pH响应的靶向机制更为简化;而与DNA纳米技术等^[38]相比,其对天然小分子结构的广泛适应性,为开发类似植物药衍生纳米药物提供了更具普适性的方法论^[39]。然而,由动态非共价键驱动的组装体,其长期物理稳定性、抗血浆蛋白吸附能力及体内循环完整性仍是其临床转化的关键科学瓶颈。本研究对稳定性的系统评价目前主要集中于体外释药,尚未涵盖短期或长期贮存稳定性、血浆稳定性及稀释稳定性等关键药

剂学性质,这是本研究的局限所在。

体外协同效应(CI=0.79)为其转化提供了初步药效学依据^[40],其体内命运(包括药代动力学、组织分布、肿瘤富集等)尚不明确,而SSD的潜在肝毒性在纳米剂型下的变化^[41],亦是决定其安全性的核心问题。这些生物学问题的澄清,将直接指导后续药剂学优化。未来研究可通过表面工程(如PEG化或靶向配体修饰)增强纳米粒的稳定性与肿瘤靶向性^[42];同时尝试整合免疫调节等功能组分,将治疗策略从药物协同递送扩展至药物与免疫系统的协同作用,以克服肿瘤异质性及免疫抑制微环境等挑战。制剂转化的最终成功,更取决于其生产的可放大性与质量的全面可控。这需实现从实验室制备到符合GMP的规模化生产,并建立涵盖原料、工艺到成品的完整质量控制体系与长期稳定性研究方案,这一过程是将前沿的“科学发现”转化为可靠“药品”的关键环节,也是产学研深度融合所需攻克的核心实践课题。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 胡振宇,陈春羽,施林峰,等.柴胡化学成分、药理、炮制研究进展[J].中华中医药学刊,2026,44(1):187-194.
- [2] Teng L L, Guo X W, Ma Y Z, *et al.* A comprehensive review on traditional and modern research of the genus *Bupleurum* (*Bupleurum* L., Apiaceae) in recent 10 years [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 306: 116129.
- [3] Ovando-Medina V M, García-Martínez C A, Farias-Cepeda L, *et al.* Cannabidiol encapsulation in polymeric hydrogels and its controlled release: A review [J]. *Gels*, 2025, 11(10): 815.
- [4] Xin C, Zhang Y D, Bao M L, *et al.* Novel carrier-free, charge-reversal and DNA-affinity nanodrugs for synergistic cascade cancer chemo-chemodynamic therapy [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2022, 606: 1488-1508.
- [5] 韩悦,于丽媛,卢桂兰,等.柴胡疏肝散对围绝经期抑郁模型大鼠焦虑抑郁的改善作用及机制研究[J].时珍国医国药,2024,35(6):1316-1319.
- [6] 刘晟文,刘建英.槲皮素药理学作用的研究进展[J].中华肺部疾病杂志:电子版,2020,13(1):104-106.
- [7] 谢冉.负载大麻二酚纳米胶束的制备及抗乳腺癌作用研究[D].北京:中国中医科学院,2021.
- [8] 刘静怡,周瑜,彭家昱,等.酸响应两亲性聚合物药物载体的研究进展[J].高分子通报,2021,34(12):22-30.
- [9] Zhang X Y, Hu S Y, Huang L F, *et al.* Advance progress in assembly mechanisms of carrier-free nanodrugs for cancer treatment [J]. *Molecules*, 2023, 28(20): 7065.
- [10] Chi F Y, Wang W S, Zhai S S, *et al.* Self-assembled baicalein-2,4-decadienal nanomedicine synergistically inhibits PGE₂ expression and elicits anti-inflammatory responses [J/OL]. *Chin Herb Med*, (2025-10-25) [2026-05-05]. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2025.10.001>.
- [11] Xin C, Liu S, Qu H, *et al.* The novel nanocomplexes containing deoxycholic acid-grafted chitosan and oleanolic acid displays the hepatoprotective effect against CCl₄-induced liver injury *in vivo* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 185: 338-349.
- [12] 卢照,魏慧欣,陈霞,等.透射电子显微镜样品的制备方法及技术综述[J].科学技术与工程,2023,23(19):8039-8049.
- [13] Chung J E, Tan S S, Gao S J, *et al.* Self-assembled micellar nano complexes comprising green tea catechin derivatives and protein drugs for cancer therapy [J]. *Nat Nanotechnol*, 2014, 9(11): 907-912.
- [14] Cheng T. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440-446.
- [15] Sánchez-Díez M, Romero-Jiménez P, Alegría-Aravena N, *et al.* Assessment of cell viability in drug therapy: IC₅₀ and other new time-independent indices for evaluating chemotherapy efficacy [J]. *Pharmaceutics*, 2025, 17(2): 247.
- [16] Emadi R, Amiri Z, Mortazavi Moghadam F, *et al.* Self-assembling nanocomposites for smart drug delivery: Towards personalized and stimuli-responsive therapeutics [J]. *RSC Adv*, 2026, 16(6): 5088-5127.
- [17] Chen Y M, Xu W, Liu Y, *et al.* Anomalous C suppresses tumor progression and metastasis by ubiquitinating GPX4-driven autophagy-dependent ferroptosis in triple negative breast cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(8): 2531-2550.
- [18] 朱卫丰,邓双雁,欧阳辉,等.中药多糖口服吸收及其标记技术研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(12):261-269.
- [19] Sun S J, Deng P, Peng C E, *et al.* Selenium-modified chitosan induces HepG2 cell apoptosis and differential protein analysis [J]. *Cancer Manag Res*, 2022, 14: 3335-3345.
- [20] Unnisa A, Greig N H, Kamal M A. Inhibition of Caspase 3 and Caspase 9 mediated apoptosis: A multimodal therapeutic target in traumatic brain injury [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2023, 21(4): 1001-1012.
- [21] Zaib S, Khan I, Hayyat A, *et al.* Role of mitochondrial membrane potential and lactate dehydrogenase a in

- apoptosis [J]. *Anti Cancer Agents Med Chem*, 2022, 22(11): 2048-2062.
- [22] Chen W K, Ge P X, Deng M J, *et al.* Toxicological responses of A549 and HCE-T cells exposed to fine particulate matter at the air-liquid interface [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2024, 31(18): 27375-27387.
- [23] Jiang L, Chen H Y, He C H, *et al.* Dual-modal apoptosis assay enabling dynamic visualization of ATP and reactive oxygen species in living cells [J]. *Anal Chem*, 2023, 95(6): 3507-3515.
- [24] Wang M M, Zheng D D, Zhang Y L, *et al.* Carrier-free self-assembled nanomedicines of active ingredients from pomegranate peel: An overview [J]. *Discov Nano*, 2025, 20(1): 170.
- [25] Kumar R, Dhar A, Banerjee A, *et al.* *Sustainable Practices and Technologies* [M]. Lausanne: Scientific Frontiers, 2024: 1-297.
- [26] Demİrbolat G M, Erdoğan Ö, Coşkun G P, *et al.* PEG4000 modified liposomes enhance the solubility of quercetin and improve the liposome functionality: *In vitro* characterization and the cellular efficacy [J]. *Turk J Chem*, 2022, 46(4): 1011-1023.
- [27] Gao Q, Feng J, Liu W C, *et al.* Opportunities and challenges for co-delivery nanomedicines based on combination of phytochemicals with chemotherapeutic drugs in cancer treatment [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 188: 114445.
- [28] Chou T C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors [J]. *Adv Enzyme Regul*, 1984, 22: 27-55.
- [29] Lan J S, Qin Y H, Liu L, *et al.* A carrier-free folate receptor-targeted ursolic acid/methotrexate nanodelivery system for synergetic anticancer therapy [J]. *Int J Nanomed*, 2021, 16: 1775-1787.
- [30] Zhu Y, Deng X, Wu Y, *et al.* Formation mechanism of herpetrine self-assembled nanoparticles based on pH-driven method [J]. *Chin Chem Lett*, 2025, 36(1): 109733.
- [31] Yu S H, Webber M J. Engineering disease analyte response in peptide self-assembly [J]. *J Mater Chem B*, 2024, 12(42): 10757-10769.
- [32] Seltzer E S, Watters A K, MacKenzie D, *et al.* Cannabidiol (CBD) as a promising anti-cancer drug [J]. *Cancers*, 2020, 12(11): 3203.
- [33] Yavuz B R, Jang H, Nussinov R. Discovering anticancer drug target combinations via network-informed signaling-based approach [J]. *Commun Med*, 2025, 5(1): 428.
- [34] 关月宏, 刘桂梅, 刘雨思, 等. 柴胡皂苷 D 通过 Akt/mTOR 通路调控胰腺癌 Panc-1 细胞凋亡及自噬 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(19): 5278-5284.
- [35] Ding J R, Sun A P, Hu H, *et al.* Potential targets and mechanisms of saikosaponin D in psoriasis: A bioinformatic and experimental study on oxidative stress [J]. *J Inflamm Res*, 2025, 18: 16487-16507.
- [36] Mall J, Naseem N, Haider M F, *et al.* Nanostructured lipid carriers as a drug delivery system: A comprehensive review with therapeutic applications [J]. *Intell Pharm*, 2025, 3(4): 243-255.
- [37] 张永苗, 王爱潮, 杜晓英, 等. 智能给药系统的响应机制和递送载体的临床应用进展 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(4): 1065-1073.
- [38] Sun X F, Zhang Y Z, Lu X, *et al.* Research progress of enzyme-free DNA self-assembly technology in rapid detection of food safety [J]. *J Food Compos Anal*, 2025, 148: 108556.
- [39] Xu X Q, Xu X, Wang Y, *et al.* Self-assembled natural product-based carrier-free nanoplateforms for efficient bioactivity [J]. *J Exp Res Pharm*, 2022, 7(4): 223-233.
- [40] Rao C N R, Thomas P J, Kulkarni G U. *Nanocrystals: Synthesis, Properties and Applications* [M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007: 1-182.
- [41] Fu Y C, Liang S B, Luo M, *et al.* Intratumoral heterogeneity and drug resistance in cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2025, 25(1): 103.
- [42] Zhou P, Shi W, He X Y, *et al.* Saikosaponin D: Review on the antitumour effects, toxicity and pharmacokinetics [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 1478-1487.

[责任编辑 郑礼胜]