

pH 敏感性的 TAT 肽修饰胶束的制备及其体外评价

陈 卫, 金明姬, 高钟镐*, 王丽萍, 朴海峰

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 本文采用具有 pH 敏感性的硬脂酰磺胺甲氧嘧啶、mPEG2000-DOPE 和 TAT 肽 (transactivator of transcription peptide) 修饰的聚乙二醇化磷脂, 以薄膜分散法制备了载阿霉素的聚合物胶束。pH 敏感胶束在 pH 7.4 的粒径约为 20 nm, 阿霉素的包封率为 $(99.1 \pm 2.1)\%$ 。流式细胞术显示, pH 7.4 和 pH 6.8 时 TAT 修饰的胶束均可迅速被摄取; 而 pH 敏感胶束在 pH 7.4 时进入细胞较少, pH 6.8 时进入细胞增多, 孵育 1 h 后摄取量接近 TAT 修饰胶束。激光共聚焦显示 pH 敏感胶束在 pH 6.8 时肿瘤细胞摄取量显著大于 pH 7.4。结果说明, 该胶束具有 pH 敏感性, pH 7.4 时屏蔽 TAT 肽, 避免其无选择性的透膜进入细胞, 而在 pH 6.8 时暴露出 TAT 肽, 发挥其进入细胞的能力, 介导载药胶束进入肿瘤细胞, 实现特异性杀伤肿瘤细胞的目的。此 pH 敏感胶束是一种有前景的肿瘤靶向给药系统。

关键词: 细胞穿膜肽; 聚合物胶束; pH 敏感; 阿霉素

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 05-0599-06

Preparation and *in vitro* evaluation of pH-sensitive TAT peptide conjugated micelles

CHEN Wei, JIN Ming-ji, GAO Zhong-gao*, WANG Li-ping, PIAO Hai-feng

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Doxorubicin loaded micelles were prepared by film-hydration method using stearyl sulfadiazine (SA-SD) which is pH sensitive, methoxy (polyethylene glycol)-2000-1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (mPEG-DOPE) and transactivator of transcription (TAT) peptide conjugated PEG-DOPE. Mean diameter of the pH-sensitive micelles was about 20 nm with a $(99.1 \pm 2.1)\%$ drug entrapment efficiency at pH 7.4. Flow cytometry studies revealed that the simple TAT micelles was taken up rapidly at the same level at pH 6.8 and pH 7.4. However, the pH-sensitive micelles entered the tumor cell less at pH 7.4 and significantly increase at pH 6.8. After 1 h incubation at pH 6.8, the amount of the pH-sensitive micelles taken up by cancer cell 4T1 was almost similar to simple TAT micelles. The confocal microscopy indicated that the pH-sensitive micelles entered the 4T1 cells at pH 6.8 more than at pH 7.4. It was indicated that the pH-sensitive micelles could shield TAT peptide at normal pH 7.4 and deshield it at pH 6.8. Hence, TAT peptides lead the drug-loaded micelles into the tumor cells and killed them selectively. The pH-sensitive micelle may provide a novel strategy for design of cancer targeting drug delivery system.

Key words: cell-penetrating protein; polymer micelle; pH-sensitive; doxorubicin

收稿日期: 2011-01-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873168).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63028096, E-mail: zgao@imm.ac.cn

理想的给药系统应能特异性地聚集于治疗部位,并穿透靶向细胞将药物传递到细胞内。近年来,促进细胞膜转运的多肽类物质 (cell-penetrating proteins, CPPs) 发展迅速,代表性物质是 TAT 肽 (transactivator of transcription peptide) 小分子。TAT 是一种具有很强的细胞膜穿透性的多肽,它可以无选择性地穿透所有细胞的细胞膜进入细胞核^[1]。Torchilin 等^[2]研究发现 TAT 修饰的载体在体外细胞实验中具有很强的靶向性,但在体内 TAT 肽可与血清蛋白结合,不但缩短了载体在体内循环的时间,而且降低了载体穿过肿瘤血管的量,降低了肿瘤的治疗效果。

文献^[3]报道,将人类癌细胞接种于小鼠体内,用 ¹H、¹⁹F 和 ³¹P 来测定肿瘤 pH 值,结果发现肿瘤 pH 平均值为 6.84,低于正常血液和组织液的 pH 7.4,推测主要原因在于肿瘤细胞吸收和代谢葡萄糖的速度较正常细胞快,肿瘤细胞产生过量乳酸导致细胞内的 pH 值降低。许多基于肿瘤组织的 pH 特性的主动靶向给药系统研究取得一定成果^[4]。Engin 等^[5]利用 pH 敏感的脲键,构建了一种 PEG 保护 TAT 肽的纳米胶束,但 pH 5.0 远低于肿瘤组织的 pH。Sethuraman 等^[6]发现聚合磺胺甲氧嘧啶能有效地将 TAT 隐藏在 PEG-PLA 聚合物胶束内,并在肿瘤的较低 pH 时 (6.6~7.0) 释放 TAT 肽。Lee 等^[7]发现 TAT-聚组氨酸-聚乙二醇-聚乳酸材料制备的阿霉素胶束通过在正常 pH 有效隐藏 TAT,在肿瘤组织释放 TAT,使胶束能够克服肿瘤的多药耐药,降低药物的毒性。

阿霉素是临床常用的化疗药物,其分子易于降解,并且由于选择性差而导致对正常组织的毒副作用大,限制了其临床应用。针对此问题,包载阿霉素的主动靶向脂质体^[8]和胶束^[9]等研究取得了一定的进展。Tang 等^[10]发现聚乙二醇化磷脂包载阿霉素的胶束能够提高药物体内抗肿瘤效果,降低药物的系统毒性。Lee 等^[11]制备了 TAT 修饰的阿霉素壳聚糖共轭物,能提高药物的细胞毒性。但 TAT 肽修饰在载体表面会一定程度导致载体进入正常组织,降低其肿瘤靶向性。因此,制备一种在正常组织和血液环境中能隐藏 TAT 肽,而在肿瘤组织中暴露 TAT 肽的给药系统具有重要意义。

为了降低 TAT 修饰胶束在正常组织的穿透性,发挥 TAT 肽对肿瘤细胞的高穿透性优势,本文利用肿瘤 pH 较低的特征,以 pH 敏感的硬脂酰磺胺甲氧嘧啶、PEG-DOPE 和 TAT-PEG-DOPE 为材料,构建一种在体内循环过程中隐藏细胞穿膜肽 TAT,穿过肿瘤血管进入肿瘤酸性微环境后,自动弹出 TAT,介导

载体实施主动转运的包载阿霉素的纳米给药系统 (图 1)。磺胺甲氧嘧啶在 pH 7.0 以上时具有负电荷,会将带有正电的 TAT 肽吸附在胶束的具有负电荷的内核表面,将 TAT 肽隐藏,避免其无选择性地进入正常组织;到达肿瘤组织时,由于 pH 低于 7.0,磺胺甲氧嘧啶呈正电荷,TAT 肽从胶束内核解离,暴露在胶束表面,介导载药胶束进入肿瘤细胞,从而选择性杀伤肿瘤细胞。在构建胶束的基础上,本文对 pH 敏感胶束的特征进行表征,并评价了其在不同 pH 条件下进入肿瘤细胞的能力。

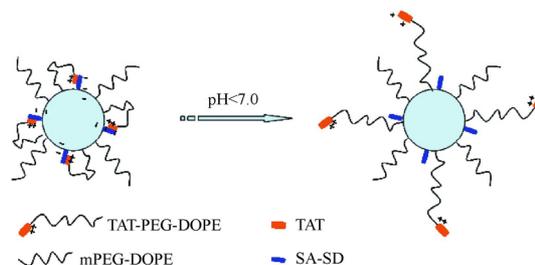


Figure 1 Schematic model of the proposed drug delivery system: the carrier system consists of three components, a TAT-PEG-DOPE, a PEG-DOPE, and a pH-sensitive compound SA-SD (stearyl sulfadiazine). At normal blood pH (pH 7.4), the sulfadiazine is negatively charged, and when mixed with the TAT-micelles, shields the TAT by electrostatic interaction. Only PEG is exposed to the outside which could make the carrier circulating longer; when the system experiences a decrease in pH (near tumor pH 6.8) sulfonamide will lose charge and detach, thus exposing TAT for interaction with tumor cells

材料与方法

药品与试剂 阿霉素购自北京华奉联博有限公司;DOPE、FITC-DOPE 和 mPEG2000-DOPE 均购自美国 Avanti Polar Lipids 公司;三乙胺和 CL-4B 琼脂糖购自美国 Sigma 公司,聚乙二醇 3000 二对硝基苯碳酸酯 [(pNP)₂-PEG3000] 购自上海炎平生物科技有限公司, TAT 肽 (YGRKKRRQRRR) 由吉尔生化上海有限公司定制合成, RPMI 1640 培养基 (Gibco, 美国), 胎牛血清购自美国 Hyclon 公司;其他试剂均为分析纯。

细胞模型 4T1 细胞购自美国 ATCC 细胞库。细胞在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱条件下连续培养。实验细胞为处于对数生长期的细胞。

仪器 Zetasizer 5000 (Malvern Instruments Ltd) 激光散射粒度分析仪;透射电子显微镜 (Tecnai G² 20ST 型透射电子显微镜, FEI 公司, 美国);高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司, Agilent 1100);流式细胞

分析仪, EPICS XL (美国 Beckman Coulter 公司); 激光共聚焦显微镜 TCS SP2 (德国 Leica 公司); Thermo scientific 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 公司。

pNP-PEG-DOPE 的合成 DOPE 24 mg 溶解于氯仿 0.48 mL 中, 加入三乙胺 80 μL 。PEG-(pNP)₂ 1 g 溶解于氯仿 5 mL, 加入上述溶液中, 氮气保护下室温反应 24 h。减压除去有机溶剂。加入 0.01 mol·L⁻¹ HCl 5 mL, 0.15 mol·L⁻¹ NaCl 水浴超声, 形成胶束。利用 CL-4B 柱, 以 0.01 mol·L⁻¹ HCl, 0.15 mol·L⁻¹ NaCl 为洗脱剂, 分离除去未反应的 PEG 和反应生成 pNP。包含 pNP-PEG-DOPE 的组分冷冻干燥后, 以氯仿溶解产物, 重复两次除去 NaCl。冷冻干燥后, 采用 TLC 对 pNP-PEG-DOPE 进行定性, 展开剂: 氯仿-甲醇-水 (8:1:0.1)^[12, 13]。

TAT-PEG-DOPE 的制备 称取 pNP-PEG-DOPE 100 mg 置于 100 mL 圆底烧瓶, 加入氯仿 10 mL, 再减压除去氯仿, 形成均一的薄膜。称取 TAT 5 mg 溶解于 0.01 mol·L⁻¹ HCl 溶液中, 超声分散, 将其制备成胶束, 加入 10 mmol·L⁻¹ Tris 缓冲液 (pH 9.0), 4 °C 氮气保护下搅拌过夜。反应液置截留分子质量为 5 kD 的透析袋中, 用纯水透析 24 h, 冷冻干燥得到 TAT-PEG-DOPE^[12]。

硬脂酰磺胺甲氧嘧啶的合成 称取硬脂酸 2.0 g, 溶于无水氯仿 5 mL, 加入 1.2 摩尔量的 SOCl₂, 于沸点回流 5 h, 旋转蒸发除去氯仿与过量的 SOCl₂, 得到硬脂酰氯。称取磺胺甲氧嘧啶 2 g, 加入适量 DMAP (1.2 倍摩尔量), 加入吡啶 4 mL, 25 °C 反应 24 h, 停止反应后反应液倒入冰水中, 搅拌, 过滤沉淀, 40 °C 烘干后, 用甲醇重结晶, 得到硬脂酰磺胺甲氧嘧啶 (SA-SD), 核磁鉴定。

胶束的制备 将阿霉素溶解于甲醇中, 质量浓度为 2 mg·mL⁻¹, 加入 2 倍摩尔量的三乙胺。称取适量的 PEG-PE, SA-SD 和 TAT-PEG-PE 混合溶解于氯仿中, 加入适量的上述阿霉素溶液, 减压除去有机溶剂, 旋转成膜后, 以 pH 7.4 的 HEPES 缓冲液在 37 °C 水化, 过 0.22 μm 滤膜, 得到载药的 pH 敏感胶束^[10]。

通过加入 0.5% (PEG-PE 的摩尔量) FITC-PE, 采用同样工艺, 制备 FITC 标记的 TAT 修饰空白靶向胶束与空白 pH 敏感胶束, 用于细胞摄取实验。

pH 敏感胶束的表征

粒径与 zeta 电位 制得的胶束进行动态光散射和 zeta 电位分析, 采用 Zetasizer 5000 激光衍射粒度分析仪进行粒径和多分散度测定。仪器的激光束波长设定为 633 nm, 入射光与散射光束的夹角为 90°, 测

定温度为 25 °C。同时测定胶束的 zeta 电位。

透射电子显微镜 将铺有碳膜的铜网漂放在胶束溶液上, 俘获到胶束粒子的铜网漂放在 1% 醋酸双氧铀水溶液上, 吸干后放置过夜, 使用透射电镜仪于 120 kV 下观察。

包封率的测定 色谱条件: 色谱柱为 Cosmosil ODS C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为缓冲液 (取十二烷基硫酸钠 1.44 g 和磷酸 0.68 mL 溶于 500 mL 水中) - 乙腈-甲醇 (500:500:60), 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长为 254 nm; 进样量 20 μL 。以阿霉素峰面积 (A) 对其浓度 (C) 线性回归得到的标准曲线为: $A = 38.90C - 67.79$; $r = 0.9998$, 阿霉素在 0.5~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

采用超滤法测定载药胶束的药物包封率。向制备载药阿霉素胶束中加入 3 倍体积甲醇, 破坏胶束后, 采用 HPLC 测定总的阿霉素含量。采用截留分子质量为 30 kD 的 Millipore 超滤管, 于 4 °C 下 12 000×g 离心 10 min, 测定下层滤液中游离阿霉素的浓度。用以下公式计算胶束的包封率。其中 C_{M-DOX} 代表破坏后测定的阿霉素总浓度, C_{F-DOX} 代表超滤后下层溶液中的阿霉素浓度。

$$\text{包封率} = \frac{C_{M-DOX} - C_{F-DOX}}{C_{M-DOX}} \times 100\%$$

流式细胞检测 为了评价 pH 敏感胶束在不同 pH 条件下进入细胞的能力, 将 4T1 细胞接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 将培养液分别以 pH 6.8、7.4 的无血清培养液替代, 孵育 1 h 后, 加入 FITC 标记的载有阿霉素的 TAT 修饰靶向胶束、pH 敏感胶束, 分别孵育 15、30 min 和 1 h, 弃去培养液, 以 PBS 洗涤, 胰酶溶液消化后, 直接以流式细胞仪测定。

激光共聚焦实验 4T1 细胞培养后, 接种于 35 mm 玻底培养皿中培养 12 h 后, 细胞贴壁, 分别用 pH 7.4 和 pH 6.8 无血清培养液孵育 1 h, 再分别给予 FITC 0.1 mL 标记的 TAT 胶束和 pH 敏感胶束, 孵育 1 h 后, 弃去培养液, 以冷 PBS 洗涤 2 次, 用 3.7% 多聚甲醛 2 mL 固定 15 min, 加入冷 PBS 洗 2 次, 再加入冷 PBS 1 mL, 铝箔纸包裹, 冷藏保存。进行激光共聚焦观察。

结果与讨论

1 pH 敏感胶束的构建与表征

磺胺甲氧嘧啶是目前常用的 pH 敏感基团, 在 pH 7.0 左右呈现剧烈的转变。当 pH 大于 7.0 时, 磺胺甲

氧嘧啶的二甲氧嘧啶基团呈负电性,而在 pH 小于 7.0 时呈现中性。采用磺胺甲氧嘧啶修饰的温敏凝胶、聚合物胶束均呈现良好的 pH 敏感性。本文构建的硬脂酰磺胺甲氧嘧啶,由于疏水性硬脂酰基团插入 PEG-PE 胶束的疏水核,而磺胺甲氧嘧啶基团在生理正常 pH 7.4 时呈负电性,会将带有正电的 TAT 肽吸附到胶束内核表面,屏蔽 TAT。而在肿瘤环境 pH 6.8 时,磺胺甲氧嘧啶电荷迅速转变为中性,使 TAT 解离暴露于胶束表面。硬脂酰磺胺甲氧嘧啶的 ^1H NMR (600 Mz, CDCl_3): 氢归属如下: 8.34 (1H, s, NH), 8.33 (1H, s, NH), 7.97 (2H, d, Ar-H); 7.80 (2H, d, Ar-H); 6.72 (1H, s, Ar-H), 4.01 (3H, s, OCH_3), 3.99 (3H, s, OCH_3), 2.5 (2H, m, CH_2), 1.43 (30H, m, CH_2), 0.99 (3H, m, CH_3)。

pH 敏感胶束的透射电镜照片如图 2 所示,胶束呈圆球形,外形规整,分散性良好。采用动态光散射法

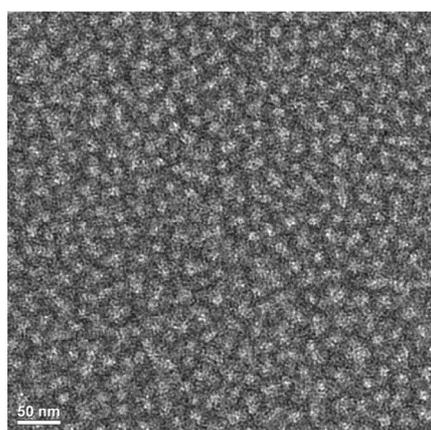


Figure 2 Transmission electron micrograph of the pH-sensitive micelles at pH 7.4. Scale bar is 50 nm

测得 TAT 肽修饰胶束的粒径为 (16.50 ± 1.03) nm; pH 敏感胶束在 pH 7.4 的粒径为 (21.16 ± 2.70) nm; 在 pH 6.8 的粒径为 (27.75 ± 2.15) nm。pH 敏感胶束在 pH 降低时,粒径略微变大,但变化不显著,如图 3 所示。

TAT 肽修饰胶束的 zeta 电位是 (-4.54 ± 1.39) mV。pH 敏感胶束在 pH 7.4 的 zeta 电位是 (-11.8 ± 2.48) mV; 在 pH 6.8 的 zeta 电位是 (-6.24 ± 2.04) mV。pH 敏感胶束在 pH 7.4 的电位负绝对值较大,说明 TAT 肽被屏蔽。pH 敏感胶束随 pH 降低至 6.8, zeta 电位显著升高,接近 TAT 修饰胶束,推测 TAT 肽被弹出, TAT 肽的正电性使胶束 zeta 电位绝对值降低。

TAT 肽修饰的靶向胶束包封率为 $(99.5 \pm 1.3)\%$; pH 敏感胶束阿霉素的包封率为 $(99.1 \pm 2.1)\%$ 。该结果与文献报道的阿霉素 PEG-PE 胶束结果无差异^[10]。说明 pH 敏感材料对药物的包封率无显著影响。

2 流式细胞检测

流式细胞检测结果如图 4 所示, A, B, C 的孵育时间分别为 15 min、30 min、1 h。TAT 修饰的胶束迅速穿透入膜,且在 pH 7.4 与 pH 6.8 时进入细胞的能力几乎相近。pH 敏感胶束孵育 15 min 后 (图 4A), 在 pH 7.4 时进入细胞能力较差,而在肿瘤酸性 pH 6.8 时进入细胞能力大大提高。随着时间的延长, pH 敏感胶束在 pH 7.4 时细胞摄取量变化较小,而在 pH 6.8 时摄取量显著增加,1 h 时接近 TAT 修饰的胶束摄取水平。推测在 pH 7.4 时 pH 敏感胶束中的 TAT 被屏蔽,进入细胞的能力下降;而在肿瘤酸性 pH 6.8 时, TAT 肽能发挥其穿膜作用进入细胞,从而在肿瘤组织内的智能释放。1 h 时 pH 敏感胶束进入细胞

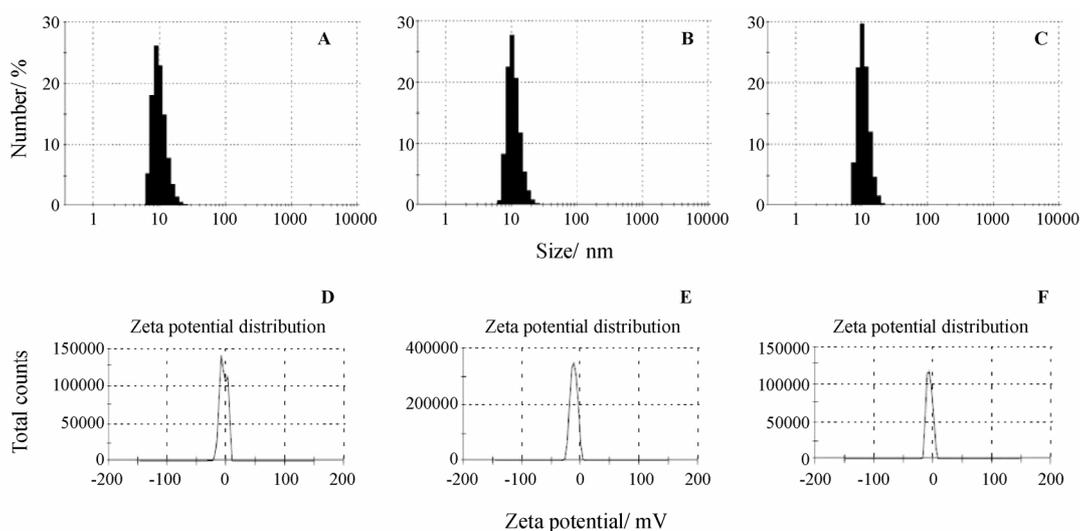


Figure 3 Particle size of A) TAT micelles, B) pH-sensitive micelles at pH 7.4, C) pH-sensitive micelles at pH 6.8; zeta potential of D) TAT micelles, E) pH-sensitive micelles at pH 7.4, F) pH-sensitive micelles at pH 6.8

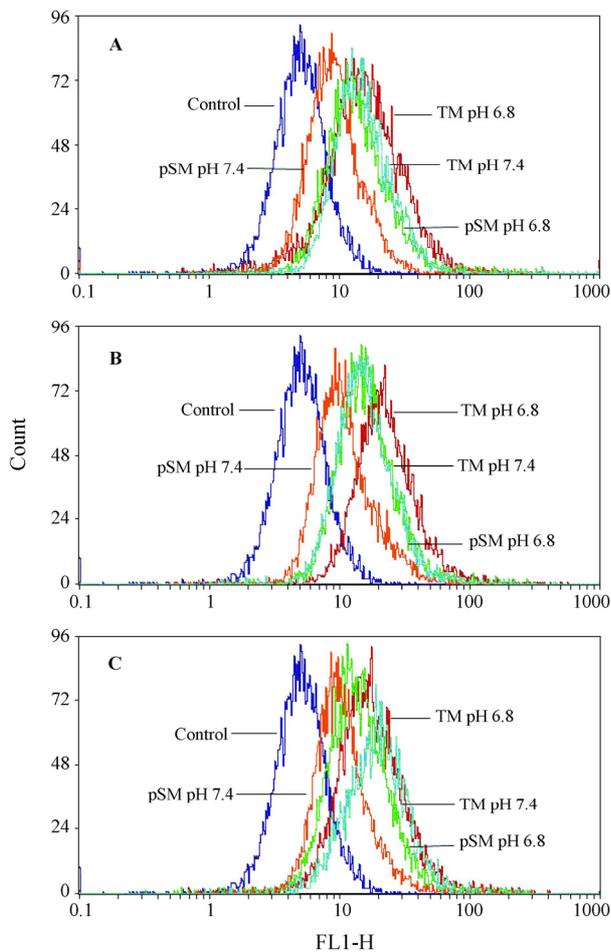


Figure 4 Flow cytometry of FITC-TAT-micelles and FITC-pSM internalized into 4T1 cells at pH 7.4 and pH 6.8 at 15 min (A), 30 min (B), 60 min (C). pSM: pH-sensitive micelles; TM: TAT conjugated micelles

的能力较 TAT 修饰胶束差,可能因为部分 TAT 未能完全被暴露出来。

3 激光共聚焦检测

以 FITC 标记的 pH 敏感胶束作为探针,观察细胞摄取。图 5 中 A 和 B 分别为 TAT 胶束在 pH 7.4 和 pH 6.8 的摄入情况,可见 TAT 修饰胶束在 pH 7.4 和 pH 6.8 进入细胞的能力相同。图 5C 为 pH 敏感胶束在 pH 7.4 的摄取情况,图 5D 为 pH 敏感胶束在 pH 6.8 的摄取情况,由图可见,pH 敏感胶束在 pH 7.4 环境下进入细胞能力较差,而在较酸性的环境下聚合物胶束分布于细胞内部,摄取显著增加。说明 pH 敏感胶束在 pH 低于 7.0 时能够释放 TAT,发挥穿膜作用进入肿瘤细胞。

pH 敏感胶束在 pH 6.8 的摄入量低于 TAT 胶束,推测可能因为部分 TAT 肽仍被吸附在胶束内核,没有完全暴露出来。Sethuraman 等^[6]采用 PEG-PSD [polyethylene glycol-poly (methacryloyl sulfadimeth-

oxine)] 制备了随 pH 改变隐藏和暴露 TAT 肽的给药系统,发现在 pH 6.6 仍有部分 TAT 不能暴露出来。由于动物体内过程比细胞水平复杂得多,此结论还有待于在动物水平进一步评价。

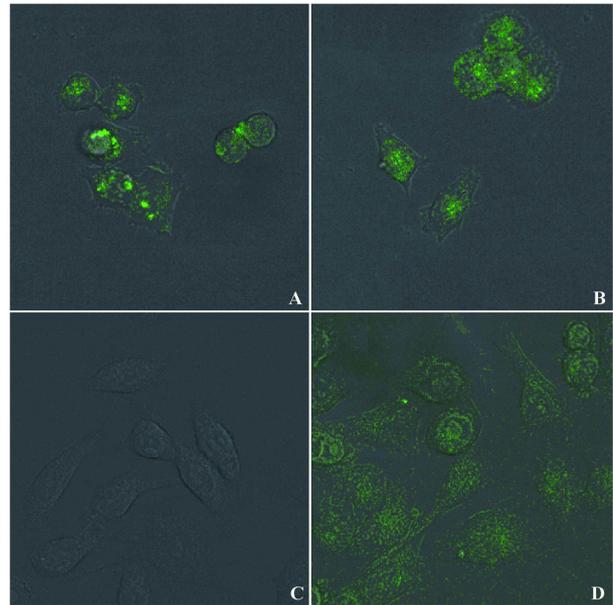


Figure 5 Confocal micrographs of 4T1 cells incubated with TAT micelles for 1 h at pH 7.4 (A) and pH 6.8 (B) respectively. The micrographs showed no difference for TAT micelles between pH 7.4 and pH 6.8. Confocal micrographs of 4T1 cells incubated for 1 h with pH-sensitive micelles at pH 7.4 (C) and pH 6.8 (D) respectively. The micrographs clearly show the shielding at pH 7.4 and deshielding at pH 6.8

结论

TAT 肽的穿膜作用显著,近年来研究揭示其穿膜作用不通过特异性的受体途径,不受温度以及细胞类型的影响。本文构建了一种 pH 敏感胶束,流式细胞术和激光共聚焦实验显示此胶束在肿瘤 pH 条件下穿膜能力增强,而在正常 pH 时进入细胞的能力低于 TAT 修饰的聚合物胶束,实现了在周围组织和体液中屏蔽 TAT 肽,而在肿瘤 pH 条件下暴露 TAT,介导胶束进入肿瘤细胞。

References

- [1] Rudolph C, Plank C, Lausier J, et al. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 11411-11418.
- [2] Torchilin VP, Levchenko TS. TAT-liposomes: a novel intracellular drug carrier [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2003, 4: 133-140.

- [3] Yamagata M, Hasuda K, Stamato T, et al. The contribution of lactic acid to acidification of tumors: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase [J]. *Br J Cancer*, 1998, 77: 1726–1731.
- [4] Xu JX, Tang JB, Zhao LH, et al. Advances in the study of tumor pH-responsive polymeric micelles for cancer drug targeting delivery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 1328–1335.
- [5] Engin K, Leeper DB, Cater JR, et al. Extracellular pH distribution in human tumors [J]. *Int J Hyperthermia*, 1995, 11: 211–216.
- [6] Sethuraman VA, Bae YH. TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors [J]. *J Control Release*, 2007, 118: 216–224.
- [7] Lee ES, Na K, Bae YH. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor [J]. *J Control Release*, 2005, 103: 405–418.
- [8] Zhao W, Ma HL, Qi XR. Cationic liposomes loaded with doxorubicin targeting to the tumor neovasculature *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 982–988.
- [9] Xu XY, Zhou JP, Li L, et al. Preparation of doxorubicin-loaded chitosan polymeric micelle and study on its tissue biodistribution in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 743–748.
- [10] Tang N, Du G, Wang N, et al. Improving penetration in tumors with nanoassemblies of phospholipids and doxorubicin [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99: 1004–1015.
- [11] Lee JY, Choi YS, Suh JS, et al. Cell-penetrating chitosan/doxorubicin/TAT conjugates for efficient cancer therapy [J]. *Int J Cancer*, 2010, 128: 2470–2480.
- [12] Torchilin VP, Levchenko TS, Lukyanov AN, et al. *p*-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains *via p*-nitrophenylcarbonyl groups [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1511: 397–411.
- [13] Wang W, Tang N, Zhang CL, et al. Cell penetrating peptides enhance intracellular translocation and function of siRNA encapsulated in pegylated liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 142–148.