

具有肿瘤靶向及穿膜效应的壳聚糖胶束的制备

刘婉婉, 张胜喻, 杨或, 朱红艳*

(南通大学药学院, 南通 226001)

摘要 在壳聚糖(CS)表面修饰疏水基团辛基形成辛基壳聚糖(OC), 然后再修饰亲水基团聚乙二醇(PEG)、肿瘤靶向配体氨基葡萄糖(DG)和穿膜肽九聚精氨酸(9R), 形成 DG 和 9R 共同修饰的、同时具有肿瘤靶向性及穿膜效应的壳聚糖纳米胶束(DG/9R-PEG-OC)。核磁共振光谱分析及聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果证实了 DG/9R-PEG-OC 的成功制备; 测得壳聚糖纳米胶束的粒径为 151.8 nm 左右、Zeta 电位约为 16.5 mV; 透射电子显微镜照片显示该壳聚糖纳米胶束为均匀的球形结构; 紫外分光光度法测定该载体的荧光素载药量约为 28.2%, 包封率约为 75.0%, 释药实验表明壳聚糖胶束具有良好的缓释作用; 荧光显微镜观察显示, 该 DG/9R-PEG-OC 胶束对肿瘤细胞尤其是葡萄糖受体高表达的肿瘤细胞 HepG2 具有较好的靶向性及细胞穿膜效应。故 DG/9R-PEG-OC 胶束可作为脂溶性抗肿瘤药物的载体用于肿瘤的靶向化学治疗。

关键词 壳聚糖胶束; 氨基葡萄糖; 聚乙二醇; 精氨酸; 靶向; 穿膜肽; HepG2

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)05-0561-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150508

Preparation of tumor-targeting chitosan micelle with transmembrane effect

LIU Wanwan, ZHANG Shengyu, YANG Yu, ZHU Hongyan*

School of Pharmacy, Nantong University, Nantong 226001, China

Abstract Chitosan(CS) surface was modified with hydrophobic octyl groups to prepare *N*-octyl chitosan (nitrogen-octyl chitosan, OC). Then hydrophilic group carboxyl-polyethylene glycol-amino (PEG), tumor-targeting ligand D-glucosamine (DG), and membrane-penetrating peptide 9-D-arginine (9R) were linked to OC successively. Then the DG and 9R modified chitosan micelle (DG/9R-PEG-OC) with tumor-targeting and transmembrane effect was prepared. By hydrogen nuclear magnetic resonance spectrometer (¹H NMR) and sodium dodecyl sulfate polyacryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the successful formation of DG/9R-PEG-OC was certified, with particle size of 151.8 nm and Zeta potential of 16.5 mV. The morphology of chitosan micelle observed by transmission electron microscope was homogeneous spherical structure. The drug loading content (DLC) (using fluorescein as a model drug) and encapsulation efficiency (EE) were about 28.2% and 75.0% measured by UV-visible spectrophotometer. Meanwhile, the drug showed a controlled releasing profile out of the micelle. Cellular uptake experiments indicated DG/9R-PEG-OC micelle had a significant tumor-targeting and transmembrane effects, especially on HepG2 cells, which exhibited high expression of the glucose transporter. Thus DG/9R-PEG-OC micelle could be a promising drug targeted delivery system of hydrophobic antitumor drugs.

Key words chitosan micelle; glucosamine; polyethylene glycol; arginine; targeting; membrane penetrating peptide; HepG2

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81202467); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2012232); the Advantaged Discipline Construction Engineering Funded Projects of Colleges and Universities in Jiangsu Province; and the Graduate Student Science and Technology Innovation Project of Nantong University (No. 14060).

壳聚糖(chitosan, CS)又称甲壳胺几丁聚糖或甲壳胺,化学名称为 β -(1,4)-2-氨基-2-脱氧-D-葡聚糖,分子式为 $(C_6H_{11}NO_4)_n$ 。壳聚糖有许多独特的优点,例如生物效应、细胞亲和性和生物降解性等,特别是壳聚糖分子中存在氨基与羟基,不同基团可以由化学改性在重复单元上引入。通过制备其衍生物,可以使壳聚糖有更多的功能^[1-3],并且改善其溶解性能。近年来,表面修饰了特异性的配体或抗体的肿瘤靶向壳聚糖纳米胶束已经成为肿瘤靶向治疗中的研究热点,该肿瘤靶向载体具有不良反应较小、特异性较高等优点。已有研究证实氨基葡萄糖(2-amino-2-deoxy-D-glucose, DG)是一种广谱的抗肿瘤靶向配体^[4-6],DG修饰的复合物可以靶向地富集到肿瘤细胞,而且可以在一定程度上抑制肿瘤细胞的生长。DG与纳米粒胶束连接后,可以很容易被肿瘤细胞表面的葡萄糖转运体识别并结合,从而实现了DG对肿瘤细胞的靶向性^[7]。在壳聚糖表面修饰了DG后,可以构建出具有肿瘤靶向性的壳聚糖载体,但是这种靶向载体有其缺点:无法穿透细胞膜,这一特点对于在细胞内发挥作用的药物有一定的限制。细胞穿膜肽是具有穿膜能力的一种多肽,能够运载生物大分子跨越细胞膜进入细胞^[8]。九聚精氨酸(9-D-arginine, 9R)^[9-10]作为一种穿膜肽,经实验证明具有相当高的穿膜效果^[11-12],可以与生物大分子结合后穿过细胞膜进入细胞内部。所以将DG与9R共同修饰到壳聚糖胶束表面,两者各自发挥其长处,从而可以构建出同时具有靶向性和穿膜能力的纳米粒胶束,使药物在肿瘤细胞内的浓度大大提高,并且没有明显的不良反应^[13]。

1 材料

1.1 药品与试剂

壳聚糖(CS, 相对分子质量150 kD, 浙江澳兴生物科技有限公司);聚乙二醇(PEG, 上海怡炎生物科技有限公司);九聚精氨酸(9R, 吉尔生化(上海)有限公司);D-氨基葡萄糖(DG)、1,2-二氯乙烷(1,2-dichloroethane, EDC)二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(n-hydroxy-succinamide, NHS)、4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine, DMAP)、二碳酸二叔丁酯[di-tert-butyl dicarbonate ester, (Boc)₂O] [阿拉

丁试剂(上海)有限公司];其余实际均为市售分析纯。

1.2 仪器

Zetasizer Nano ZS90(英国马尔文仪器有限公司);AV-500核磁共振仪(德国Bruker公司);H-7000透射电子显微镜(日本日立公司);高精密电子天平(北京赛多利斯公司);再生纤维素透析袋(截留相对分子质量3 500, 10 000, 江苏华康科技公司);UV1800PC紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);共聚焦激光扫描显微镜(南京麦迪森仪器有限公司)。

1.3 细胞株及细胞培养试剂

人肝癌细胞细胞株(HepG2)购自中国科学院生化细胞研究所。细胞培养所用 RPMI 1640 培养基、新生小牛血清、胰酶购自上海碧云天生物技术有限公司。

2 方法

DG/9R-PEG-OC的合成过程共分为5个过程:①在壳聚糖表面修饰疏水基团辛醛,形成N-辛基壳聚糖(N-octyl chitosan, OC);②氨基葡萄糖(DG)与一端羧基一端氨基的聚乙二醇(NH₂-PEG-COOH)分子结构中的羧基连接,形成DG-PEG;③DG-PEG分子结构中NH₂与丁二酸酐(succinic anhydride, SA)反应,从而使DG-PEG的一端修饰上羧基,形成DG-PEG与SA的复合物DG-PEG-SA;④将一端带有羧基活化后的DG-PEG-SA与OC分子骨架上的氨基连接,构建DG-PEG-OC;⑤9R一端的COOH活化后与DG-PEG-OC分子骨架上的氨基连接,形成DG/9R-PEG-OC复合物。DG/9R-PEG-OC复合物的具体合成过程如图1所示。

2.1 DG/9R-PEG-OC纳米粒胶束的制备

2.1.1 N-辛基壳聚糖(OC)的制备 CS 0.5 g溶于1%乙酸(25 mL)溶液中,在搅拌条件下逐滴加入辛醛(0.51 g),继续搅拌4 h后,用少量氢氧化钠调节pH 4~5,逐滴加入硼氢化钠溶液继续搅拌12 h。过滤,氢氧化钠调节pH为7,透析,冷冻干燥,即得OC。

2.1.2 氨基葡萄糖-聚乙二醇复合物(DG-PEG)的制备 首先,制备(Boc)₂O保护氨基的NH₂-PEG-COOH。反应过程如下:将NH₂-PEG-COOH 200 mg

溶于二氯甲烷 10 mL 中,加入催化剂 DMAP 20 mg,搅拌 5 min 后,冰浴条件下滴加 $(\text{Boc})_2\text{O}$ 40 mg(物

质的量比为 1:2:4),搅拌 30 min 后撤走冰浴,室温搅拌过夜后透析纯化(截留相对分子质量 1 000)。

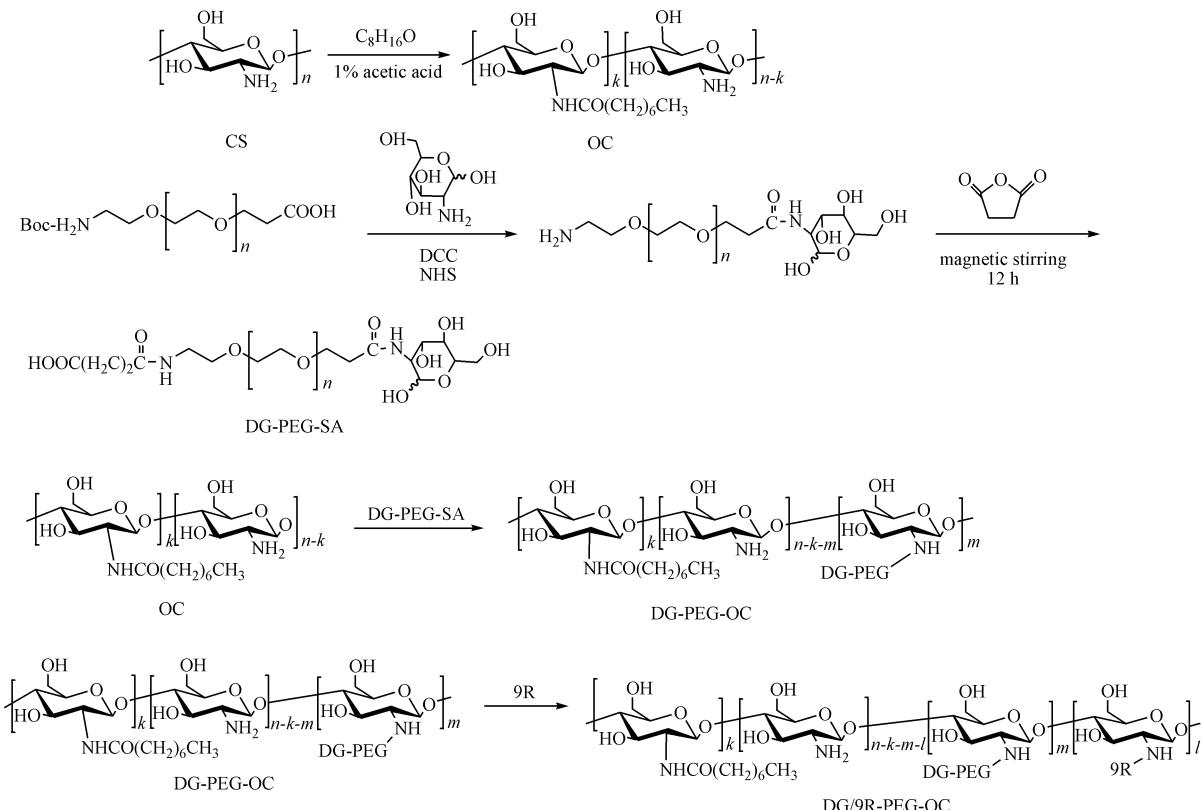


Figure 1 Synthesis of DG/9R-PEG-OC micelle

OC: *N*-octyl chitosan; DCC: dicyclohexylcarbodiimide; NHS: *n*-hydroxy-succinamide; DG: D-glucose; PEG: polyethylene glycol; SA: succinic anhydride; 9R: 9-D-arginine

Boc 保护的 $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ 与 DG 反应。反应过程:① $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ 羧基活化: $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ (200 mg) 溶于 DMF 10 mL 溶液中,加入 DCC,反应 20 min 后加入 NHS,室温条件下搅拌过夜,去除副产物。②与 DG 反应: DG 0.065 g 溶于 DMF 溶液 6 mL 中,搅拌 5 min 后加入三乙胺 35.5 mg,即 $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ 、DCC、NHS、DG、三乙胺的物质的量之比为 1:1.8:2.25:0.8:3),搅拌 15 min 后滴加到羧基端活化的 PEG 溶液中,常温反应 4 h 后脱 Boc:将 DG-PEG 溶于二氯甲烷-三氟乙酸(7:3)的体系,室温搅拌过夜脱去 PEG 氨基端上的 Boc 保护。然后做透析处理(截留相对分子质量 1 000),透析结束以后旋干。

2.1.3 氨基葡萄糖-PEG-辛基壳聚糖(DG-PEG-OC)的制备 首先将“2.1.2”项中制备的 DG-PEG 复合物与 SA 反应,使 DG-PEG 的一端修饰上羧基。具体的,分别将 DG-PEG 和 SA 按物质的量比

为 1:5 溶于水和 DMF 溶液中,室温下磁力搅拌 12 h。然后在一端修饰上羧基的 DG-PEG 水溶液中依次加入 EDC 和 NHS(DG-PEG 与 EDC 和 NHS 的物质的量比为 1:1.5:1.5),磁力搅拌 4 h,活化羧基。然后将已活化的 DG-PEG 分子中的羧基与 OC 分子中的氨基反应过夜,形成 DG-PEG-OC。反应结束后透析数天备用。

2.1.4 DG/9R-PEG-OC 纳米粒胶束的制备 将 Fmoc 保护氨基的 9R 溶于 0.1 mol/L MES 缓冲液 (pH 6.0) 中,然后依次加入 EDC 和 NHS(即 9R、EDC、NHS 的物质的量比为 1:5:2),磁力搅拌 5 h,以活化 9R 一端的羧基。将“2.1.3”项下合成的 DG-PEG-OC 溶于水溶液中,然后将已活化的 9R 与之反应 24 h。最后将 9R 上的 Fmoc 脱保护:将上述胶束溶液在旋转蒸发仪上旋干,然后用 DMF 4 mL 溶解样品,再加哌啶 1 mL,磁力搅拌 10 min。形成的 DG、9R 修饰的 $\text{NH}_2\text{-PEG-OC}$ 纳米粒胶束

DG/9R-PEG-OC, 在水溶液中透析、探头超声 5~30 min(工作时间 2 s, 间歇时间 3 s, 功率 200 W)后, DG/9R-PEG-OC 通过自组装作用形成胶束。

2.2 核磁共振

采用重水为溶剂, 分别配制质量浓度为 2 mg/mL 的 CS、OC、DG-PEG、DG-PEG-SA、DG-PEG-OC 溶液, 在核磁共振仪上测定不同溶液的核磁波谱。

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳实验

准备单纯九聚氨酸(9R), 和一定浓度的 DG/9R-PEG-OC 两种样品进行 SDS 电泳实验。分别制备 SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶, 样品准备好后进行上样, 然后在 80 V 电压下电泳 90 min。使用考马斯亮蓝染色液与考马斯亮蓝洗脱液分别进行染色与洗脱, 最后用扫描仪进行显影。

2.4 粒径和 Zeta 电位的测定

DG/9R-PEG-OC 胶束的粒径分布情况及 Zeta 电位可通过马尔文粒度电位仪来测定, 仪器测定的光源为 He 激光, 检测波长为 633 nm, 检测角度为 90°, 粒径测定范围为 2 nm~3 μm。

2.5 电镜测试

DG/9R-PEG-OC 胶束的形貌可通过透射电镜(TEM)来观察, 在 PBS 溶液中分散均匀的纳米粒悬液滴在涂有碳支持膜的铜网上, 充分干燥后在加速电压为 80 kV 的透射电镜下观察纳米粒形态。其粒径大小同样可以通过透射电镜来测定, 该结果可和马尔文粒度仪测定结果相互验证。

2.6 载药量、包封率及体外释药性能的研究

为了详细考察壳聚糖纳米胶束的载药性能, 此处选取荧光素作为模型药物。药物上载过程中, 先将一定量的荧光素溶于 DMF 溶液中, 然后在室温及磁力搅拌条件下, 将之分别缓慢滴加到壳聚糖纳米胶束水溶液 5 mL 中 OC-PEG(17.63 mg/mL)、DG-PEG-OC(10.77 mg/mL)、DG/9R-PEG-OC(10.77 mg/mL)。然后将此混合溶液置于透析袋(截留相对分子质量为 10 000)中, 并在 PBS 溶液中避光透析 5~6 h, 以使聚糖纳米胶束能充分包裹荧光素。透析结束后进行离心(12 000 r/min, 10 min), 除去未包裹的模型药物荧光素。模型药物的包合液经冷冻干燥后保存备用。测定药物的载药量(drug loading content, DLC)和包封率(encapsulation efficiency, EE)。

释药实验: 取上述载药纳米粒 DG/9R-PEG-OC 溶液 10 mL, 放在透析袋中, 在 pH 7.4 的 PBS 溶液中透析, 每隔一定时间取 PBS 透析液 5 mL(时间间隔依次为: 30 min, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 h), 并且每次加入空白 PBS 5 mL, 使用紫外可见分光光度计测得每次取样的吸收度, 做释药曲线。

2.7 细胞摄取实验

24 孔培养板的每个孔中加入 RPMI 1640 培养基培养的 HepG2 细胞(每毫升 5×10^5 个细胞)1.5 mL。并在 37 °C, CO₂ 浓度为 5%, 加湿空气环境下孵育 24 h。然后在每个孔中分别加入含有载荧光素的 OC-PEG、DG-PEG-OC 和 DG/9R-PEG-OC 纳米粒胶束的 RPMI 1640 培养基 1.5 mL。继续孵育 0.5 h 后将培养基去除, 然后用 PBS 溶液清洗 3 遍, 并用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染料染色, 最后用荧光显微镜观察细胞内纳米粒子的摄取情况。

3 结果

3.1 核磁共振波谱分析

纳米粒胶束的¹H NMR 图谱如图 2 所示, 与壳聚糖(CS)的¹H NMR 相比, 辛基壳聚糖(OC)(400 Hz, DMSO) δ : 0.84(1H, d, J = 6.9 Hz, -NH-(CH₂)₆-CH₃), 1.24(2H, s, -NH-(CH₂)₆-CH₃), 1.91(1H, s, -NH-(CH₂)₆-CH₃), 氨基葡萄糖 PEG(DG-PEG)的¹H NMR(400 Hz, DMSO) δ : 3.51(1H, s, -CH₂CH₂O-), DG-PEG-OC 的¹H NMR(400 Hz, DMSO) δ : 0.85(1H, s, -NH-(CH₂)₆-CH₃), 1.23(1H, s, -NH-(CH₂)₆-CH₃)。

3.2 SDS-PAGE 电泳实验

用纯化后的 DG/9R-PEG-OC 纳米粒胶束进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析(图 3), 以单纯 9R 作为对照, 当进样为一定浓度的 DG/9R-PEG-OC(泳道 2), 与单纯 9R(泳道 1)泳动程度相比, 表现出较高程度的阻滞效应, 这是因为 9R 的相对分子质量为 1 549, 与 DG-PEG-OC 连接以后得到的 DG/9R-PEG-OC 相对分子质量为 4 150, 与 9R 相比明显增加, 所以在 SDS-PAGE 电泳图上 DG/9R-PEG-OC 的条带明显落后于 9R 的条带, 电泳条带的延后和阻滞进一步证明了 DG-PEG-OC 纳米粒胶束成功地连接上了 9R。

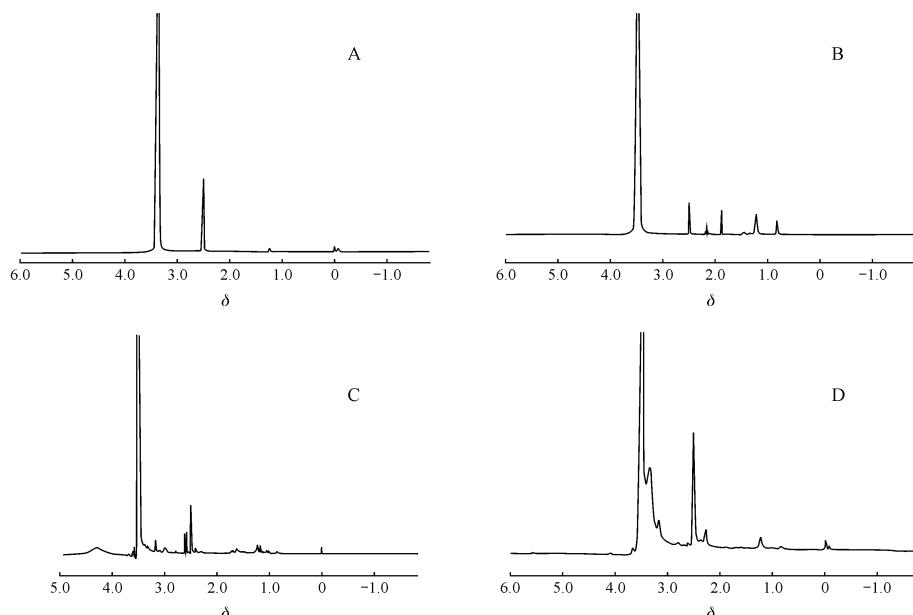


Figure 2 ^1H NMR spectra of micelles

A:CS;B:OC;C:DG-PEG;D:DG-PEG-OC

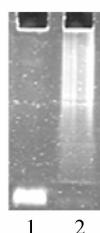


Figure 3 SDS-PAGE of 9R (Lane 1) and DG/9R-PEG-O (Lane 2)

3.3 粒径、Zeta 电位与形貌特征

粒径分布情况如图 4-A 所示, DG/9R-PEG-OC 的粒径为 151.8 nm。单纯 CS 的 Zeta 电位为 61.9 mV, DG-PEG-OC 的 Zeta 电位为 -11 mV, DG/9R-PEG-OC 的 Zeta 电位为 16.5 mV, 因为 9R 带正电荷, 所以 -11 mV 的 DG-PEG-OC 连接上 9R 之后 Zeta 电位变为正值。

DG/9R-PEG-OC 纳米粒胶束样品的形貌通过 TEM 表征, 结果如图 4-B 所示, DG/9R-PEG-OC 纳米粒较好的分散为单个粒子, 而且呈近似球形。

TEM 所测得的粒径数据还可以和经马尔文粒度仪测定的结果进行相互验证。TEM 检测 DG/9R-PEG-OC 的粒径在 50~80 nm 范围内, 经马尔文粒度仪测定的结果是 DG/9R-PEG-OC 的粒径大约在 150 nm, TEM 图片中粒子的粒径小于水相中粒径, 这是因为壳聚糖胶束纳米粒是高度溶胀的弹性粒子, 在 TEM 点样过程中, 随着水分的蒸发粒子

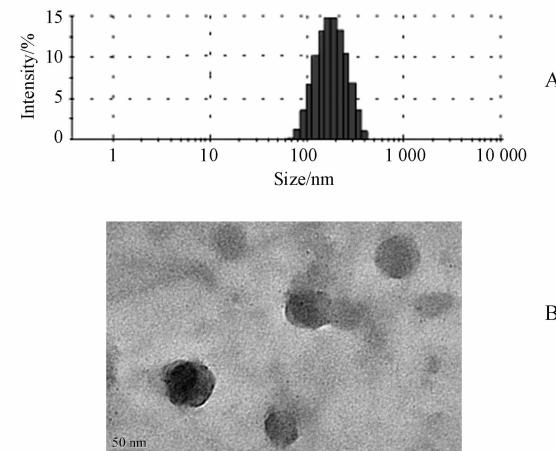


Figure 4 Characteristics of micelles

A: Size distribution of DG/9R-PEG-OC micelle; B: Transmission electron microscope (TEM) picture of DG/9R-PEG-OC micelle

出现了一定程度的收缩^[14~15]。

3.4 载药量、包封率及释药性能的测定

OC-PEG、OC-PEG-DG 和 DG/9R-PEG-OC 的载药量和包封率结果如表 1 所示, DG/9R-PEG-OC 表现出了较高的载药量, 由此可见修饰了 DG 和 9R 的 DG/9R-PEG-OC 壳聚糖胶束仍具有较好的载药性能; 3 种纳米粒胶束的包封率虽然都在 75% 左右, 所以用这种纳米粒胶束可以较好地装载药物, 减少体内游离药物的浓度, 从而降低游离药物的毒性。图 5 显示了荧光素在纳米胶束中的释药

模式, 荧光素在释药初期有一个明显的突释现象, 大约有60%的荧光素在12 h内释放。经过短暂的快速释放之后, 荧光素进入了一个缓慢释放的过程, 一直到释药96 h以后, 大约75%的荧光素被释放。荧光素PBS溶液的标准曲线回归方程为: $Y = 4.7951X - 0.1998$ ($r^2 = 0.9982$)。

Table 1 Drug loading content (DLC) and encapsulation efficiency (EE) of PEG-OC, DG-PEG-OC and DG/9R-PEG-OC

Micelle	DLC/%	EE/%
PEG-OC	23.3	75.5
DG-PEG-OC	26.2	74.9
DG/9R-PEG-OC	28.2	75

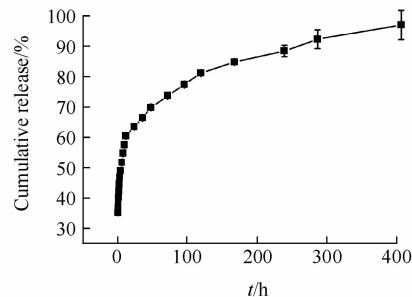


Figure 5 *In vitro* release of fluorescein from DG/9R-PEG-OC micelle ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.5 肿瘤细胞靶向摄取实验

本实验采用荧光显微成像技术, 分别观察 PEG-OC、DG-PEG-OC 和 DG/9R-PEG-OC 载荧光素纳米粒胶束被 HepG2 细胞摄取的情况。荧光素可以自发绿色荧光; 纳米粒胶束载体载药后被荧光素标记了绿色荧光; 而肿瘤细胞的细胞核则被 DAPI 染料染色, 表现为蓝色。细胞摄取结果如图 6 显示: 在最初孵育的 0.5 h 内, PEG-OC 胶束几乎不被 HepG2 摄取, DG-PEG-OC 胶束对 HepG2 细胞有少量靶向摄取作用, 而 DG/9R-PEG-OC 胶束由于 DG 肿瘤靶向和 9R 穿细胞膜的双重效应在孵育 0.5 h 的时候就大量聚集在 HepG2 细胞细胞膜上, 并有少量进入胞浆内; 孵育 1 h 后, PEG-OC 胶束仍然只有微量聚集在膜表面, 而 DG-PEG-OC 和 DG/9R-PEG-OC 的载荧光素纳米粒胶束均可以不同程度扩散进入 HepG2 细胞, 其中 DG-PEG-OC 胶束在细胞膜上与细胞浆内有不同程度的聚集, DG/9R-PEG-OC 胶束进入 HepG2 细胞胞浆内的量最大, 在细胞胞浆可见大量载有荧光素的 DG/9R-PEG-OC 胶束纳米粒。细胞摄取实验的结果进一步证实了

DG/9R-PEG-OC 通过 9R 的穿膜作用与 DG 的靶向作用, 可以更多地被肿瘤细胞尤其是葡萄糖转运体高表达的肿瘤细胞所摄取, 从而能发挥载药后靶向抑制肿瘤细胞增强药效的作用。

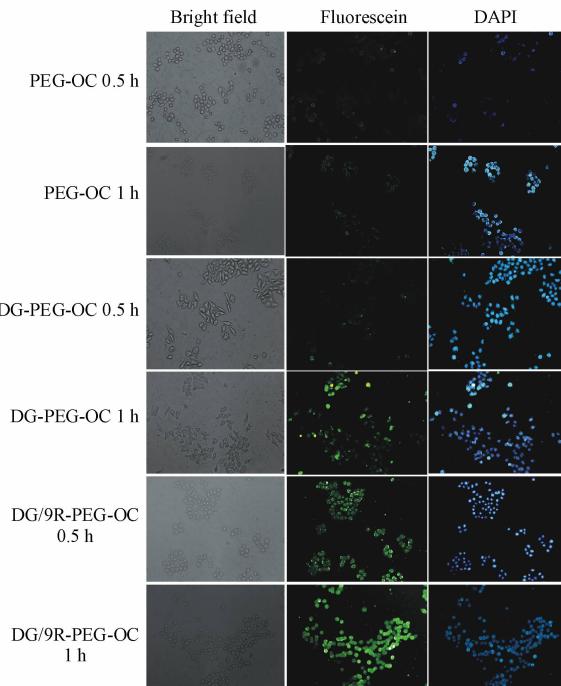


Figure 6 *In vitro* cellular uptakes of fluorescein loaded PEG-OC, DG-PEG-OC and DG/9R-PEG-OC micelles imaged by fluorescence microscope

4 总 结

本实验制备的 DG/9R-PEG-OC 纳米粒胶束具有较好的形貌特征及载药释药性能, 还能进一步改善壳聚糖的肿瘤靶向性与穿膜效应, 这是因为 DG/9R-PEG-OC 同时具有 DG 与 9R 的优点: DG 虽然可以通过其受体介导的细胞内吞途径, 特异性地被葡萄糖转运体高表达的肿瘤细胞识别、摄取, 但是其进入细胞胞浆内的能力有限^[4]; 9R 具有增加细胞膜穿透性的作用^[9-10], 但是它缺乏肿瘤靶向性^[16-17]。本实验成功构建的双配体(DG 和 9R)修饰的肿瘤靶向的 NH₂-PEG-OC 纳米粒胶束, 在具备靶向作用的同时又具有穿膜能力, 从而可以增加药物进入肿瘤细胞内的数量。

参 考 文 献

- [1] Brijesh KS, Sirohi R, Archana D, et al. Porous chitosan scaffolds: a systematic study for choice of crosslinker and growth factor

- incorporation [J]. *Int J Polymer Mater*, 2015, **5**(64):242–252.
- [2] Zhang L, Zhang N. Advances of chitosan and its derivatives in drug delivery system [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床志), 2014, **33**(1):9–14.
- [3] Hu HY, Zhu H. Adsorption of heavy metal ions by chitosan and its derivatives [J]. *Prog Chem* (化学进展), 2012, **24**(11):2212–2223.
- [4] Li SW, Tian JM, Jin J, et al. Targeted biodistribution of aminoglucose-modified doxorubicin. [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2012, **43**(3):266–270.
- [5] Nijsten MW, van Dam GM. Hypothesis: using the Warburg effect against cancer by reducing glucose and providing lactate [J]. *Med Hypotheses*, 2009, **73**(1):48–51.
- [6] Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond [J]. *Pharmacol Ther*, 2009, **121**(1):29–40.
- [7] Chen J, Chen HY, Cui SS, et al. Glucosamine derivative modified nano structured lipid carriers for targeted tumor delivery [J]. *J Mater Chem*, 2012, **22**:5770–5783.
- [8] Lindgren M, Hällbrink M, Prochiantz A, et al. Cell-penetrating peptides [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, **21**(3):99–103.
- [9] Meloni BP, Milani D, Edwards AB, et al. Neuroprotective peptides fused to arginine-rich cell penetrating peptides: neuroprotective mechanism likely mediated by peptide endocytic properties [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, **153**:36–54.
- [10] Yin HQ, Zhang YH, Wang H, et al. The expression of fusion protein Myc-R₉-EGFP and identification of its transmembrane ability [J]. *Biomed Eng* (生物医学工程学杂志), 2012, **29**(3):508–513.
- [11] Wei YF. The application of cell-penetrating peptide in algae cells transducing allogenic material [D]. Shandong: Graduate School of Chinese Academy of Sciences (Marine Research Institute), 2014.
- [12] Zhang N, Bai Y, Zhao JZ, et al. Preparation and penetrating effect of the polyarginine enhanced green fluorescence protein fusion protein [J]. *Chi J Biotechnol* (生物工程学报), 2013, **29**(11):1644–1653.
- [13] Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, et al. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27 Kip1 induces cell migration [J]. *Nat Med*, 1998, **4**(12):1449–1452.
- [14] Giacomelli C, Schmidt V, Borsali R. Nanocontainers formed by self-assembly of poly(ethylene oxide)-b-poly(glycerol monomethacrylate)-drug conjugates [J]. *Macromolecules*, 2007, **40**:2148–2157.
- [15] Morita T, Horikiri Y, Suzuki T, et al. Preparation of gelatin micro-particles by co-lyophilization with poly(ethylene glycol): characterization and application to entrapment into biodegradable microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2001, **219**(1/2):127–137.
- [16] Ding Y, Wang Y, Opoku-Damoah Y, et al. Dual-functional bio-derived nanoparticles for apoptotic antitumor therapy [J]. *Biomaterials*, 2015, **72**:90–103.
- [17] Shan L, Liu M, Wu C, et al. Multi-small molecule conjugations as new targeted delivery carriers for tumor therapy [J]. *Int J Nanomed*, 2015, **10**:5571–5591.