

医药与日化原料

含铁离子纳米络合物的制备及其 诱导肿瘤细胞铁死亡作用

张潇童¹, 周凯悦², 徐文男¹, 徐强³, 尹浩东¹, 郭修晗^{1,4*}

(1. 大连理工大学 化工学院 药理学系, 辽宁 大连 116024; 2. 呼伦贝尔学院 化学与化工学院, 内蒙古 呼伦贝尔 021008; 3. 大连理工大学 分析测试中心, 辽宁 大连 116024; 4. 大连理工大学 宁波研究院, 浙江 宁波 315016)

摘要: 铁死亡是一种新发现的程序性细胞死亡过程, 与铁依赖的脂质过氧化代谢有关。以表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 和 Fe^{3+} 配合形成的 Fe^{III} EGCG 网络结构为纳米载体, 负载铁死亡诱导剂索拉菲尼 (SRF), 制备了 $\text{SRF}@\text{Fe}^{\text{III}}$ EGCG 纳米络合物。对其进行了粒径、Zeta 电位及各物质的质量分数的测定, 并测试了 $\text{SRF}@\text{Fe}^{\text{III}}$ EGCG 纳米络合物中 SRF 的封装率和载药量。体外细胞实验表明, $\text{SRF}@\text{Fe}^{\text{III}}$ EGCG 纳米络合物对 HeLa 细胞的生长抑制作用明显, 细胞存活率约为 30%。此外, 发现 $\text{SRF}@\text{Fe}^{\text{III}}$ EGCG 纳米络合物存在多种形式的肿瘤细胞生长抑制相协同的效果, 诱导细胞铁死亡确实是其作用途径之一。

关键词: 金属-多酚网络; 索拉菲尼; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 铁死亡; 医药原料

中图分类号: R943; R965

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2022) 06-1218-05

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Preparation of iron-containing nanocomplex and its inducing ferroptosis in tumor cells

ZHANG Xiaotong¹, ZHOU Kaiyue², XU Wennan¹, XU Qiang³, YIN Haodong¹, GUO Xiuhan^{1,4*}

(1. Department of Pharmacy, School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hulunbuir University, Hulunbuir 021008, Inner Mongolia, China; 3. School of Analysis and Testing Center, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China; 4. School of Ningbo Research Institute, Dalian University of Technology, Ningbo 315016, Zhejiang, China)

Abstract: Ferroptosis is a newly discovered cell death process related to iron-dependent lipid peroxidation metabolism. The coordination of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and Fe^{3+} formed Fe^{III} EGCG network structure. Then, ferroptosis inducer sorafenib (SRF) was loaded on Fe^{III} EGCG network structure to prepare $\text{SRF}@\text{Fe}^{\text{III}}$ EGCG nanocomplex. The particle size and Zeta potential of $\text{SRF}@\text{Fe}^{\text{III}}$ EGCG nanocomplex and the mass fraction of each substance in $\text{SRF}@\text{Fe}^{\text{III}}$ EGCG nanocomplex were tested. The encapsulation rate and drug loading of SRF in $\text{SRF}@\text{Fe}^{\text{III}}$ EGCG nanocomplex were measured. Cell tests *in vitro* showed that $\text{SRF}@\text{Fe}^{\text{III}}$ EGCG nanocomplex had obvious inhibitory effect on the growth of HeLa tumor cells, and the survival rate of tumor cells was about 30%. In addition, it was found that the nanocomplex had a synergistic effect on tumor cell growth inhibition in various forms, and induction of cell ferroptosis was indeed one of the ways of action of the nanocomplex.

Key words: metal-polyphenol network; sorafenib; epigallocatechin gallate; ferroptosis; drug materials

铁死亡于 2012 年被提出来, 是一种代谢性细胞死亡, 生化特征表现为脂质活性氧 (ROS) 增多、

铁离子累积等。超微形态学特征显示细胞膜断裂, 线粒体变小及双层膜密度增高、线粒体嵴减少或消

收稿日期: 2021-12-02; 定用日期: 2022-01-29; DOI: 10.13550/j.jxhg.20211237

基金项目: 国家自然科学基金 (21506024); 教育部留学回国人员科研启动基金 (No. 49); 中央高校基本科研业务费 (DUT20LK08)

作者简介: 张潇童 (1998—), 女, 硕士生, E-mail: 631520054@qq.com. 联系人: 郭修晗 (1981—), 男, 副教授, E-mail: kakumicin@dlut.edu.cn.

失、外膜破裂, 细胞核大小正常、但缺乏染色质凝聚等现象^[1]。铁死亡机制主要依赖细胞内两个相互抗衡的生化过程, 即脂质过氧化物的产生和消除^[2]。铁离子和多聚不饱和脂肪酸 (PUFAs) 作为脂质过氧化过程的原料推动铁死亡的发生, 而以还原性谷胱甘肽 (GSH) 作为底物的谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 则反向调控铁死亡^[3-4]。随着对铁死亡机制研究的深入, 研究人员发现, 诱导癌细胞铁死亡可以抑制癌细胞分化、迁移以及减少耐药性^[5-11]。

表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 是绿茶中含量最高的多酚类物质^[12], EGCG 可以通过如 p53 途径、STAT3 途径、Akt 途径等多种途径, 调控促凋亡基因的上调和促凋亡蛋白的级联反应, 以及抗凋亡基因的下调, 以此来诱导肿瘤细胞凋亡^[13-18]。金属离子在医药领域是另一类极具研究价值的物质, 在各种疾病的诊断和治疗等方面起着重要的作用。多酚分子和金属离子可以通过配位螯合作用在水溶液中快速自组装形成金属-多酚网络结构 (MPN)。近年来, 这种金属-多酚网络结构开始作为一种多功能的表面涂层材料, 广泛应用于仿生学、材料学和生物医学等领域, 同时作为一种载药平台, 使 MPN 结构在载药领域具有极高的潜在价值^[19]。

综上, MPN 作为载药平台可实现多机制或多靶点的联合或协同的抗肿瘤作用。如图 1 所示, 以具有铁死亡诱导活性的索拉菲尼 (SRF) 为内核, 基于铁离子和多酚构建 MPN 结构将其包裹, 铁离子可与 SRF 协同调控铁死亡, 多酚选择具有抗肿瘤活性的 EGCG, 制备 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物, 并评价其抑制肿瘤细胞增殖活性。

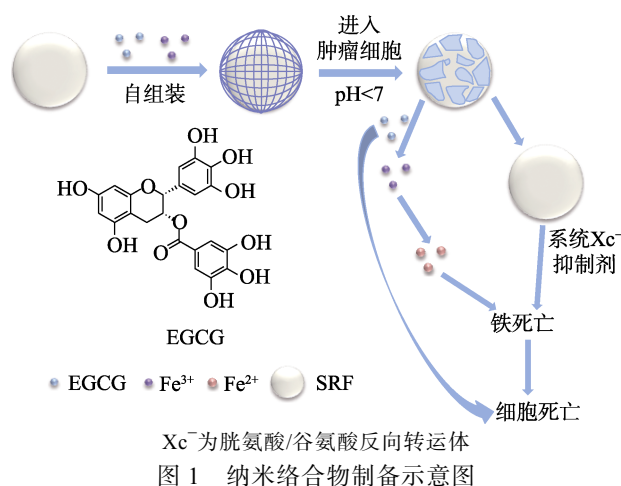


图 1 纳米络合物制备示意图

Fig. 1 Schematic diagram of nanocomplexes preparation

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

索拉菲尼 (SRF)、铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1), AR, 安耐吉化学试剂有限公司; 铁离子

螯合剂去铁胺 (DFO), AR, 美国 Supelco 公司; 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG), AR, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; FeCl₃·6H₂O, AR, 天津市永大化学试剂开发中心; 无水甲醇, AR, 天津市富宇精细化工有限公司; N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), AR, 汕头市西陇化工股份有限公司; 冰醋酸, AR, 天津市博迪化工有限公司; 浓硫酸、浓硝酸, AR, 天津市化学试剂三厂; 甲醇, 色谱纯, 二甲基亚砜 (DMSO), AR, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 人体宫颈癌细胞 (Hela), 宝生物工程 (大连) 有限公司; Hyclone™ DMEM(H)培养基、青霉素溶液、链霉素溶液、磷酸盐缓冲液 (pH=7.2±0.2), 北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清, 德国 PAN-Biotech 公司; 噻唑蓝 (MTT), BR, 江苏凯基生物技术股份有限公司。

AS5150A 超声波清洗器, 天津奥特塞恩斯仪器有限公司; ST 16R 高速冷冻离心机, 美国 Thermo Fisher 公司; SB-2000 旋转蒸发器, 上海爱博仪器有限公司; FD-5N 冷冻干燥机, 日本 EYELA 东京理化器械株式会社; E2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; AVIO 500 电感耦合等离子体发射光谱仪, 美国 Perkin-Elmer 公司; ZS90 纳米粒径和 Zeta 电位分析仪, 德国 Malvern 公司; Tecan SPARK 多功能微孔检测仪, 瑞士 Tecan 公司。

1.2 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物的制备

按文献[20]方法, 在频率为 40 Hz 的超声条件下向 20 mL 去离子水中加入质量浓度为 40 g/L 的 SRF 溶液 (溶剂 DMF) 50 μL; 随后, 同时加入 60 μL 质量浓度为 40 g/L 的 EGCG 水溶液和 50 μL 质量浓度为 10 g/L 的 FeCl₃·6H₂O 水溶液, 超声反应 5 min 后, 使 EGCG 中的一OH 与 Fe³⁺ 自组装螯合在 SRF 纳米晶体表面上形成 Fe^{III}EGCG 网络结构; 在 8000 r/min 下离心 15 min, 收集沉淀, 沉淀经过多次去离子水洗去除多余的 EGCG 和 Fe³⁺ 后, 在 -80 °C 下冷冻干燥 3 h, 制备出 1.3 mg SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物, 后续按照文献的方法放大投药量制备。

1.3 粒径分布的测定

制备出 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物后, 取 10 mg 该纳米络合物至 20 mL 去离子水中, 超声使其分散均匀, 取 2~4 mL SRF@Fe^{III}EGCG 纳米分散液至样品槽中, 室温下用纳米粒径和 Zeta 电位分析仪对纳米络合物进行粒径分布测定。

1.4 Zeta 电位的测定

制备出 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物后, 取 10 mg 该纳米络合物至 20 mL 去离子水中, 超声使其分散均匀, 取 2 mL SRF@Fe^{III}EGCG 纳米分散液至样品槽中, 室温下用纳米粒径和 Zeta 电位分析仪对纳米络合物进行电位分析。

1.5 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物中 SRF 包封率和载药量的测定

1.5.1 SRF 标准曲线的绘制

(1) 色谱条件:

色谱柱为反相 C18 柱;流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=70:30$ 的混合液(含体积分数 2% 的冰醋酸);流动相流速: 1 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20 μL ; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 测定方法: 将 SRF 溶于一定量的甲醇中, 配制出 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的母液, 分别稀释成浓度为 50、100、200、300、400、500、600 $\mu\text{mol/L}$ 的 SRF 溶液, 并在 254 nm 波长下进行 HPLC 测定。用所测得的峰面积为纵坐标, SRF 浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 为横坐标, 绘制出 SRF 标准曲线, 标准曲线方程为 $y=27724.78008x-263873.45467$, $R^2=0.99931$ 。

1.5.2 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物中 SRF 包封率的测定

参照文献[21]的方法。将 2.5 mg SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物超声分散在 20 mL 甲醇中, 超声 5 min 使负载的 SRF 溶于甲醇中, 在 8000 r/min 下离心 10 min 后, 取上清液过 0.2 μm 有机滤膜(尼龙 66), 在 254 nm 波长下进行 HPLC 测定, 将得到的峰面积带入所求得的标准曲线中计算得到 SRF 浓度, 进一步根据式(1)计算出 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物的包封率, 每组平行 3 次。

$$A/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (1)$$

式中: A 为包封率, %; m_1 为 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物中 SRF 的质量, g; m_2 为投入的 SRF 质量, g。

1.5.3 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物中 SRF 载药量的测定

将 2.5 mg SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物超声分散在 20 mL 甲醇中, 超声 5 min 使负载的 SRF 溶于甲醇中, 在 8000 r/min 下离心 10 min 后, 取上清液过 0.2 μm 有机滤膜(尼龙 66), 在 254 nm 波长下进行 HPLC 测定, 将得到的峰面积带入所求得的标准曲线中计算得到 SRF 浓度, 进一步根据式(2)计算出 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物的载药量, 每组平行 3 次。

$$B/\% = \frac{m_1}{m_3} \times 100 \quad (2)$$

式中: B 为载药量, %; m_1 为 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物中 SRF 的质量, g; m_3 为测试用 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物的质量, g。

1.6 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物中 Fe³⁺质量分数的测定

准确称取 2.5 mg SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物, 加入 1 mL 浓硫酸加热使其变为红棕色或黑色后, 再

加入 3~4 mL 浓硝酸, 溶液变成淡黄色, 待有机物全部溶解硝化后, 用 25 mL 容量瓶定容, 取少许溶液进行电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES)测定。

1.7 细胞培养及纳米络合物体外细胞实验

将 HeLa 细胞在含体积分数为 10% 的胎牛血清、100 IU/mL (IU 指 1 min 转化 1 μmol 底物的酶量) 青霉素和质量浓度为 100 g/L 的链霉素 DMEM(H) 培养基中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 在体积分数为 5% 的 CO₂ 潮湿气氛中培养。将 HeLa 细胞接种在 96 孔板(每孔 5×10^3 个)中孵育 24 h, 之后分 3 组, 每组 4 复孔, 每孔加入 50 μL 负载 6 $\mu\text{mol/L}$ SRF 的 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物, 其中两组再分别加入 50 μL 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fer-1 或 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 DFO 与 HeLa 细胞共同孵育 24 h, 每组均设置对照组、空白组。考察 Fer-1 和 DFO 自身毒性的细胞实验分为两组, 分别为加入 100 μL 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fer-1 或 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 DFO 与 HeLa 细胞共同孵育 24 h, 每组均设置对照组、空白组。之后每孔加入 20 μL MTT 反应 4 h, 终止培养, 吸出培养液并用 100 μL PBS 冲洗 3 次, 每孔再加入 200 μL DMSO, 振荡 5 min, 放入多功能微孔检测仪中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、490/570 nm 下测定每孔吸光度(OD 值), 通过式(3)计算 HeLa 的细胞存活率。同时对 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fer-1 以及 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 DFO 进行细胞毒性测定, 排除 Fer-1 与 DFO 本身毒性对细胞活力的干扰。

$$D/\% = \frac{\text{OD}_2 - \text{OD}_0}{\text{OD}_1 - \text{OD}_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: D 为细胞存活率, %; OD_0 空白组的 OD 值; OD_1 为对照组的 OD 值; OD_2 为实验组的 OD 值。

2 结果与讨论

2.1 粒径分析

测得制备的 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物的平均粒径分布如图 2 所示。

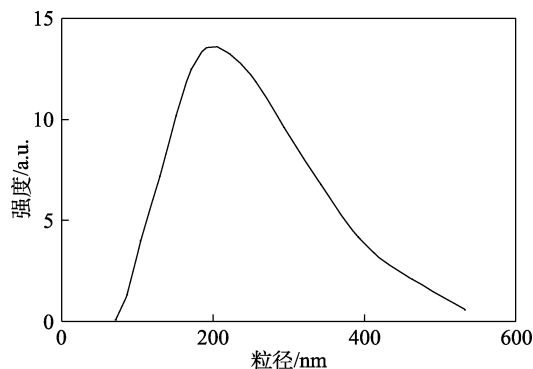


图 2 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物的粒径分布
Fig. 2 Particle size distribution of SRF@Fe^{III}EGCG nanocomplex

由图 3 可知, 纳米络合物粒径分布均匀, 平均流体力学直径为 205.6 nm, 满足纳米药物的尺寸要求。

2.2 Zeta 电位分析

Zeta 电位是用于判断纳米粒子稳定性的参数, 其绝对值越大, 纳米粒子稳定性越好。SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物的 Zeta 电位如图 3 所示。

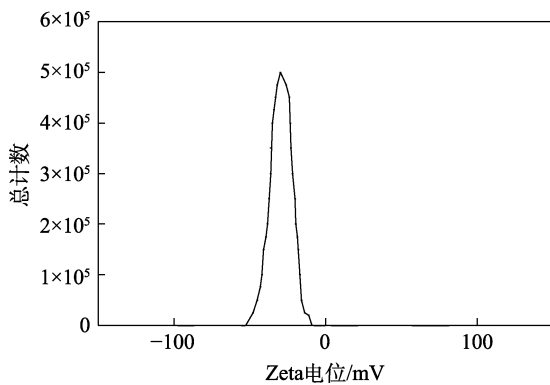


图 3 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物的 Zeta 电位

Fig. 3 Zeta potential of SRF@Fe^{III}EGCG

由图 3 可知, SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物的 Zeta 电位为 -30 mV, 表明该纳米粒子稳定性良好。

2.3 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物中 SRF 包封率和载药量分析

通过高效液相色谱仪, 平行测定 3 次, 由标准曲线方程 $y=27724.78008x-263873.45467$ 计算, SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物的包封率为 51.1%, 表明 SRF 被载体包封程度较高, 利用程度较高。SRF 载药量为 92.0%, 说明 SRF 于载体上有较高的负载率。

2.4 Fe³⁺质量分数分析

精确称取与测定包封率时相同的药物质量, 通过电感耦合等离子体发射光谱仪测定硝化后的 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物中 Fe³⁺质量分数, 平行测定 3 组, 其质量分数为 1.4%。通过上述 SRF 的载药量及 Fe³⁺质量分数的测定, 可以计算得到 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物中各物质的质量分数, 如图 4 所示。SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物中各组分物质的量比为 $n(\text{EGCG}) : n(\text{Fe}^{3+}) : n(\text{SRF}) = 1 : 1.79 : 14.14$ 。

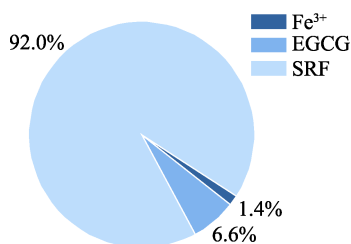


图 4 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物中各成分的质量分数

Fig. 4 Mass fraction of SRF@Fe^{III}EGCG nanocomplex

2.5 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物体外细胞实验

图 5 为铁死亡抑制剂对加入 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物后的细胞存活率的影响。由图 5 组别 1 可知, 加入 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物后, HeLa 细胞的生长得到明显抑制, HeLa 细胞存活率约为 30%。如图 5 组别 2、3 所示, 当加入 Fer-1 或 DFO 后, HeLa 细胞存活率分别为 55%和 49%, 与图 5 组别 1 相比, 分别提高 25%和 19%, 这分别与 Fer-1 可抑制 SRF 诱导的肿瘤细胞铁死亡, DFO 可络合 Fe³⁺, 抑制铁死亡有关。结果表明, 制备的 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物可诱导肿瘤细胞发生铁死亡。同时使用了 Fer-1 后仍有一定的细胞死亡率, 这可能与纳米络合物存在多种形式的肿瘤细胞生长抑制相协同作用有关^[22]。

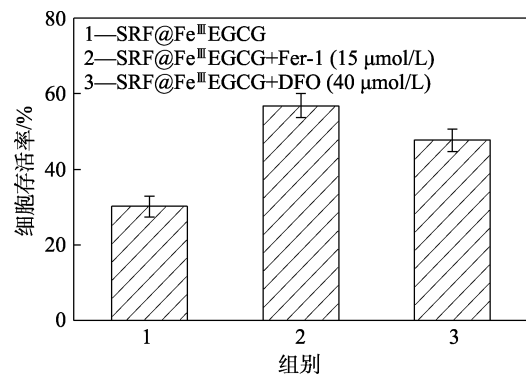


图 5 Fer-1 对加入 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物后的细胞存活率的影响

Fig. 5 Effect of Fer-1 on cell viability after adding SRF@Fe^{III}EGCG nanocomplex

此外, 考察了 Fer-1 及 DFO 的使用对 HeLa 细胞存活率的影响。分别加入 Fer-1 及 DFO 后测定 HeLa 细胞存活率, 如图 6 所示。由图 6 可知, 加入 Fer-1 后, HeLa 细胞存活率都能保持 88%以上, 表明单独使用 Fer-1 或 DFO 对细胞存活率的变化影响不大, 也说明细胞存活率的降低与 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物的使用有关。

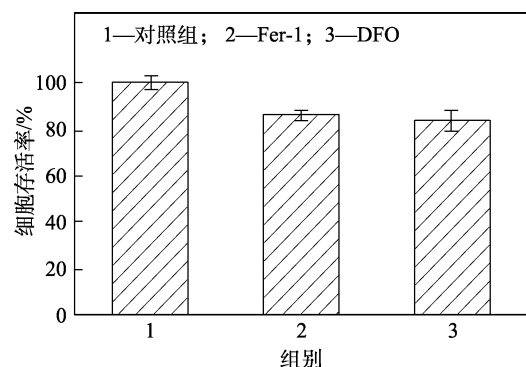


图 6 铁死亡抑制剂自身细胞毒性

Fig. 6 Self-cytotoxicity of ferroptosis inhibitors

3 结论

利用金属-多酚网络结构的特性,设计、制备了一种 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物,实现多种药物协同的效果。制备的 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物平均流体力学直径为 205.6 nm,粒径分布均匀;Zeta 电位为-30 mV,纳米粒子较稳定;包封率和载药量分别为 51.1%和 92.0%,各组分物质的量比为 $n(\text{EGCG}) : n(\text{Fe}^{3+}) : n(\text{SRF}) = 1 : 1.79 : 14.14$;证明纳米络合物的成功合成。体外细胞实验表明,SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物对 HeLa 细胞的生长抑制作用明显,细胞存活率约为 30%,当加入 Fer-1 及 DFO 后,细胞存活率有所提高,表明制备的 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物可通过诱导细胞铁死亡过程促使肿瘤细胞死亡。

设计的 SRF@Fe^{III}EGCG 纳米络合物作为一种以 MPN 结构为载体的新型纳米络合物,为之后的纳米药物设计以及耐药癌症治疗提供了一种思路。

参考文献:

- [1] SCOTT J D, KATHRYN M L, MICHAEL R L, *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [2] XIE Y X, HOU W L, SONG X X, *et al.* Ferroptosis: Process and function[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2016, 23(3): 369-379.
- [3] YE Z, LIU W S, ZHUO Q F, *et al.* Ferroptosis: Final destination for cancer[J]. *Cell Proliferation*, 2020, 53(3): e12761.
- [4] D'HERDE K, KRYSKO D V. Ferroptosis oxidized PEs trigger death[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(1): 4-5.
- [5] SUZY V T, DAVID H M, BIBBIN T P. Iron and cancer[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2018, 38(1): 97-125.
- [6] SU Y W, ZHAO B, ZHOU L F, *et al.* Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anti-cancer drugs[J]. *Cancer Letters*, 2020, 483: 127-136.
- [7] YANG W S, KIM K J, GASCHLER M M, *et al.* Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(34): E4966-E4975.
- [8] WAN S Y, ROHITHA S, MATTHEW E W, *et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 317-331.
- [9] WAN S Y, BRENT R S. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(3): 234-245.
- [10] RON S, MIKHAIL S S, DEREK A P. Resolving the role of lipoxygenases in the initiation and execution of ferroptosis[J]. *ACS Central Science*, 2018, 4(3): 387-396.
- [11] LUBRANO V, BALZAN S. LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage[J]. *Free Radical Research*, 2014, 48(8): 841-848.
- [12] KHAN N, AFAQ F, SALEEM M, *et al.* Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(5): 2500-2505.
- [13] ELENA L, YVES M D, RAYMOND M, *et al.* Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as adjuvant in cancer therapy[J]. *Clinical Nutrition*, 2013, 32(6): 894-903.
- [14] ANSHU M R, SHRINATH B, SANTOSH K K. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells *via* modulation in protein expression of p53 and bax and caspase-3 activation[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2005, 4(1): 81-90.
- [15] GU J J, QIAO K S, SUN P, *et al.* Study of egcg induced apoptosis in lung cancer cells by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2018, 22(14): 4557-4563.
- [16] MARIA I C, RAFAL Z, MARIA J L, *et al.* Implication of Akt, ERK1/2 and alternative p38MAPK signalling pathways in human colon cancer cell apoptosis induced by green tea egcg[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 84: 125-132.
- [17] PENG G, DAN A D, STEPHANIE J M, *et al.* Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2006, 45(5): 309-319.
- [18] CHEN Y, WANG X Q, ZHANG Q, *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits colorectal cancer stem cells by suppressing wnt/ β -catenin pathway[J]. *Nutrients*, 2017, 9(6): 572.
- [19] LIANG H S, LI J, HE Y, *et al.* Engineering multifunctional films based on metal-phenolic networks for rational pH-responsive delivery and cell imaging[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016, 2(3): 317-325.
- [20] LIU T, LIU W L, ZHANG M K, *et al.* Ferrous-supply-regeneration nanoengineering for cancer-cell-specific ferroptosis in combination with imaging-guided photodynamic therapy[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(2): 12181-12192.
- [21] FENG C (冯超). Nanogels system based on chitosan for oral drug delivery and the study of its transport mechanism across intestinal epithelium[D]. Qingdao: Ocean University of China (中国海洋大学), 2014.
- [22] LI C Q (李超群), TANG H X (汤红霞), ZHANG Y (张悦), *et al.* Advance in construction of ferroptosis-inducing nanomedicine for cancer therapy[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica (药学报)*, 2020, 55(9): 2099-2109.
- [17] AN B Y, FAN H L, WU Z F, *et al.* Ultrasound-assisted enantioselective esterification of ibuprofen catalyzed by a flower-like nanobioreactor[J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 565.
- [18] MEMARPOOR-YAZDI M, KARBALAEI-HEIDARI H R, DORODMAND M M. Enantioselective hydrolysis of ibuprofen ethyl ester by a thermophilic immobilized lipase, ELT, from *Rhodothermus marinus*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 130: 55-65.
- [19] YANG G S, YING L, OU Z M, *et al.* Resolution of ibuprofen ester by catalytic antibodies in water-miscible organic-solvents[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2009, 17(3): 506-512.
- [20] GONAWAN F N, YON L S, KAMARUDDIN A H, *et al.* Effect of co-solvent addition on the reaction kinetics of the lipase-catalyzed resolution of ibuprofen ester[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2013, 88(4): 672-679.
- [21] HABIBI Z, MOHAMMADI M, YOUSEFI M. Enzymatic hydrolysis of racemic ibuprofen esters using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on different supports[J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(4): 669-676.
- [22] SANCHEZ A, VALERO F, LAFUENTE J, *et al.* Highly enantioselective esterification of racemic ibuprofen in a packed bed reactor using immobilised *Rhizomucor miehei* lipase[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27(1): 157-166.
- [23] CARVALHO P O, CONTESINI F J, BIZACO R, *et al.* Optimization of enantioselective resolution of racemic ibuprofen by native lipase from *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2006, 33(8): 713-718.
- [24] YADAV G D, LATHI P S. Lipase catalyzed transesterification of methyl acetoacetate with *n*-butanol[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2005, 32(3): 107-113.

(上接第 1217 页)