

硫酸软骨素载药胶束靶向肿瘤细胞内高尔基体 治疗肿瘤转移的初步研究*

周红利¹, 李少宏², 陈丹¹, 赵婷¹, 龚涛¹, 李佳^{3△}

1. 四川大学华西药学院 靶向药物与释药系统教育部重点实验室(成都 610041); 2. 重庆医药(集团)股份有限公司(重庆 400010);
3. 四川大学华西口腔医院(成都 610041)

【摘要】目的 本研究旨在初步探究共载吡柔比星(pirarubicin, THP)与长春瑞宾(vinorelbine, VRL)的硫酸软骨素胶束(chondroitin sulfate-modified micelles, CSmicelles)的肿瘤细胞内高尔基体的靶向性及其体外抗肿瘤转移效果。**方法** 采用流式细胞术考察小鼠乳腺癌细胞株4T1摄取CSmicelles情况及摄取机制;通过共定位实验对CSmicelles的高尔基体靶向性进行初步研究;采用GM130免疫荧光实验考察共载THP与VRL的CSmicelles(THP+VTL-CSmicelles)对高尔基体结构的影响;最后通过细胞划痕实验和Transwell迁移/侵袭实验对THP+VTL-CSmicelles的体外抗肿瘤转移效果进行初步评价。**结果** CSmicelles能显著增加药物的入胞能力,其细胞摄取途径为网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞,为能量依赖性的主动转运,并具有良好的肿瘤细胞内高尔基体靶向性。THP+VTL-CSmicelles能破坏高尔基体结构,显著抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭。**结论** THP+VTL-CSmicelles具有肿瘤细胞高尔基体靶向性,可发挥靶向效应,抑制肿瘤细胞转移。

【关键词】 高尔基体靶向 肿瘤转移 硫酸软骨素 胶束 长春瑞宾

Preliminary Study on Drug-Loaded Chondroitin Sulfate-Modified Micelles Targeting Golgi Apparatus in Tumor Cells for the Treatment of Tumor Metastasis ZHOU Hong-li¹, LI Shao-hong², CHEN Dan¹, ZHAO Ting¹, GONG Tao¹, LI Jia^{3△}

1. Key Laboratory of Drug Targeting and Delivery System of the Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Chongqing Pharmaceutical (Group) Co., Ltd, Chongqing 400010, China; 3. West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: lijia816@163.com

【Abstract】 Objective To make preliminary exploration into the Golgi apparatus targeting of chondroitin sulfate-modified micelles (CSmicelles) co-loaded with pirarubicin (THP) and vinorelbine (VRL) in tumor cells, as well as their *in vitro* anti-tumor metastasis effect. **Methods** The cellular uptake efficiency and internalization mechanism of CSmicelles in 4T1 mouse breast cancer cell line were investigated by flow cytometry. Preliminary study of the Golgi apparatus targeting CSmicelles in tumor cells was conducted by co-localization experiment. Then, the effect of CSmicelles co-loaded with THP and VRL (THP+VTL-CSmicelles) on the structure of Golgi apparatus was investigated by GM130 immunofluorescence experiment. Finally, the *in vitro* anti-tumor metastasis ability of THP+VTL-CSmicelles was evaluated by wound healing assay and Transwell migration/invasion assay. **Results** It was found that CSmicelles could significantly increase cellular uptake of drugs. CSmicelles were internalized into cells through clathrin-mediated and caveolin-mediated endocytosis, which was energy-dependent active transport and exhibited substantial ability of targeting Golgi apparatus in tumor cells. THP+VTL-CSmicelles could break down the structure of Golgi apparatus and significantly inhibit the migration and invasion of tumor cells. **Conclusion** THP+VTL-CSmicelles demonstrate high affinity towards Golgi apparatus in tumor cells, exert targeted effects and inhibit tumor cell metastasis, which provides a novel idea and method for the treatment of cancer metastasis.

【Key words】 Golgi apparatus targeting Tumor metastasis Chondroitin sulfate Micelles Vinorelbine

癌症是一种常见的恶性疾病,死亡率高,每年有近1000万人死于癌症^[1]。据悉90%以上的癌症患者死于肿瘤转移^[2]。肿瘤转移是一个侵袭-转移级联的多步骤生物学过程,首先原发肿瘤细胞局部侵入周围组织、进入淋巴管或血液中并存活,然后经血管外渗进入远端组织,最终适应微环境并在远端组织定植生长^[3]。目前FDA批准的抗肿瘤

转移的药物主要分为抗血管生成抑制剂和基质金属蛋白酶抑制剂两类,但它们在临床上的治疗效果不佳^[4]。这可能是多种因素引起的,包括药物缺乏特异性、肿瘤细胞产生耐药以及癌细胞的迁移侵袭机制发生变化等^[4-5]。故亟需寻找有效的方法治疗癌症转移。

高尔基体是囊泡转运过程中的重要枢纽^[6],参与多种蛋白质的翻译后修饰、分选和运输^[7-8],在肿瘤转移过程中发挥着重要作用。破坏高尔基体结构可能会影响肿瘤

* 国家自然科学基金(No. 81872804)资助

△ 通信作者, E-mail: lijia816@163.com

转移相关蛋白的表达水平,如基质金属蛋白酶^[9]、血管内皮生长因子^[10]、高尔基体磷酸蛋白3^[11]和高尔基体跨膜糖蛋白^[12]。因此,高尔基体可能成为抗肿瘤转移的特殊靶点。硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)是一种天然存在的酸性黏多糖,具有CD44受体(在多种肿瘤细胞表面过表达)靶向性^[13-14];且本课题组前期研究发现CS具有高尔基体靶向性^[15]。因此,以CS为载体构建纳米递送系统包载高尔基体结构干扰剂,靶向肿瘤细胞内高尔基体,破坏高尔基体的结构,有望治疗癌症转移。

我们前期构建的共载化疗药——吡柔比星(pirarubicin, THP)和高尔基体结构干扰剂——长春瑞滨(vinorelbine, VRL)的硫酸软骨素胶束给药系统(THP+VRL-CSmicelles)能够显著地抑制肿瘤生长,表现出良好的体内外抗肿瘤效果^[16]。但前期研究未涉及THP+VRL-CSmicelles的抗肿瘤转移作用,故本研究旨在初步探究THP+VRL-CSmicelles的肿瘤细胞内高尔基体靶向性及其体外抗肿瘤转移效果。

1 材料和方法

1.1 主要药品与试剂

酒石酸VRL(湖北宏中药业股份有限公司,白色粉末,纯度99.0%);THP(四川百利药业有限公司,红色粉末,纯度99.0%);硫酸软骨素-胆固醇聚合物(chondroitin sulfate-cholesterol polymers, CS-Chol,自制);FITC-CS-Chol(自制);二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(distearoyl phosphatidylethanolamine-polyethylene glycol, DSPE-mPEG₂₀₀₀,上海芃硕生物科技有限公司);高糖DMEM不完全培养基(江苏凯基生物科技有限公司);胎牛血清(美国Gibco公司);高尔基体红光染料(江苏凯基生物技术有限公司);GM130抗体(美国Novus公司);青霉素、链霉素、胰酶粉末、PBS、DAPI均购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2 主要仪器

BP 211D电子天平(德国Sartorius公司);BD FACSCelesta流式细胞分析仪(美国BD);UPH-II-10优普超纯水仪(成都超纯科技有限公司);移液枪(德国Eppendorf公司);激光共聚焦显微镜LSM 800(德国Zeiss公司);MCO-17AC型CO₂培养箱(日本Sanyo公司);Transwell小室(美国Costar公司);Axiovert 40倒置荧光显微镜(德国Zeiss公司)。

1.3 实验细胞

小鼠乳腺癌细胞株4T1,购自ATCC,由本实验室保种。培养条件:将4T1细胞用高糖DMEM完全培养基(使

用高糖DMEM不完全培养基,加入1%青霉素/链霉素和10%胎牛血清配制而成)在37℃、体积分数为5% CO₂的恒温培养箱中培养,隔天传代。取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.4 实验方法

1.4.1 载药CS胶束的制备 根据本课题组所建立的方法^[16],采用超声-透析法,制备共载药CS胶束(THP+VRL-CSmicelles)、单载THP的CS胶束(THP-CSmicelles)和单载VRL的CS胶束(VRL-CSmicelles)。将CS-Chol替换成FITC-CS-Chol,制备FITC标记的CS胶束(FITC labeled CSmicelles)。

1.4.2 细胞摄取实验 采用流式细胞术定量考察细胞摄取CS胶束的情况。如参考文献所述^[15],取4T1细胞接种于12孔板中(细胞密度为1×10⁵/孔),置于孵箱中培养。24 h后加入1 mL分别含有THP/VRL的混合溶液(free THP/VRL)和THP+VRL-CSmicelles的培养基,给药质量浓度按THP量计算为10 μg/mL,同时设置对照孔(不给药组)和复孔(n=3),继续孵育。分别在给药2 h或4 h后用胰酶消化并收集细胞,2 000 r/min离心4 min,收集细胞沉淀,经PBS洗涤3遍,重悬于0.4 mL PBS中,应用流式细胞仪定量检测细胞中THP的荧光强度,用以表征细胞对free THP/VRL和THP+VRL-CSmicelles的摄取量。

1.4.3 摄取抑制实验 采用摄取抑制实验考察细胞摄取CS胶束的途径。各抑制剂的功能如下:叠氮钠为能量抑制剂^[17],氯丙嗪可抑制网格蛋白介导的内吞作用^[18],甲基β-环糊精和制霉菌素可抑制小窝蛋白介导的内吞作用^[19],阿米洛利可抑制巨胞饮作用^[20]。如参考文献所述^[15],取4T1细胞接种于12孔板中(细胞密度为1×10⁵/孔),培养24 h后,分别加入1 mL含不同摄取抑制剂的无血清无抗培养基,组别设为叠氮钠组、氯丙嗪组、甲基β-环糊精组、制霉菌素组和阿米洛利组,各抑制剂的终质量浓度分别为1 mg/mL、20 μg/mL、13.0 μg/mL、27.8 ng/mL和5.3 ng/mL,同时设置对照孔(不加摄取抑制剂)和复孔(n=3),置于培养箱中孵育。另取一细胞板加1 mL无血清无抗培养基(未予任何抑制剂处理),于4℃冰箱中孵育,进行温度依赖性实验,从侧面考察CS胶束的细胞摄取途径是否为能量依赖型。1 h后向各细胞孔板加入1 mL含THP+VRL-CSmicelles的培养基,给药质量浓度为10 μg/mL(按THP量计算),继续孵育1 h。胰酶消化并收集细胞,2 000 r/min离心4 min,收集细胞沉淀,用PBS洗涤并重悬,于流式细胞仪中检测制剂的细胞摄取量。

1.4.4 高尔基体共定位实验 如参考文献所述^[21],取4T1细胞接种于共聚焦小皿中(细胞密度为1×10⁴/皿),培

养24 h后加入1 mL含FITC labeled CSmicelles的培养基(FITC质量浓度为1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$),继续孵育。1 h后用PBS洗净,体积分数为4%多聚甲醛室温固定10 min, PBS洗涤,加入200 μL 配好的高尔基体红光染料,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色30 min,弃去染液, PBS洗3次;为增强高尔基体着色效果,加入2% BSA溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, PBS洗净;最后加入150 μL DAPI染液孵育10 min,着染细胞核, PBS洗净,使用激光共聚焦显微镜拍摄并采集图片。

1.4.5 GM130免疫荧光实验 如参考文献所述^[21],取4T1细胞接种于共聚焦小皿中(细胞密度为 $1 \times 10^4/\text{皿}$)培养24 h后,分别加入1 mL含THP-CSmicelles、VRL-CSmicelles和THP+VRL-CSmicelles的培养基继续孵育12 h,其中THP与VRL给药质量浓度均为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,另设置对照组(不给药组)。取出小皿,体积分数为4%多聚甲醛室温固定10 min, PBS洗涤3次,0.2% Triton X-100 PBS溶液孵育5 min,对细胞进行透明化处理。为了封闭非特异性蛋白,用含2% BSA的PBS溶液室温孵育1 h, PBS洗涤,加入100 μL GM130抗体(纯化IgG,1:200,1% BSA溶液稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS洗净后加入100 μL Alexa Fluor 594标记的二抗(抗IgG,1:500,1% BSA溶液稀释)室温染色1 h, PBS洗净,加100 μL DAPI染液孵育10 min,着染细胞核, PBS洗净,使用激光共聚焦显微镜拍摄并采集图片。不同视野下随机取30个细胞,用Image J软件统计高尔基体碎片的数量,定量分析高尔基体结构破坏程度。

1.4.6 伤痕愈合实验 根据预实验结果选择36 h作为该实验的药物作用时间,具体实验过程如下,取4T1细胞接种于6孔板中(细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{孔}$)培养,待细胞密度至80%时,用10 μL 的枪头划一条直线, PBS洗涤3次,除去细胞残渣。分别向每孔加入2 mL含药培养基继续孵育36 h,组别设置为free THP、free VRL、free THP/VRL、THP-CSmicelles、VRL-CSmicelles和THP+VRL-CSmicelles,其中THP与VRL给药质量浓度均为60 ng/mL,设置对照孔(不给药组)和复孔($n=3$)。分别在0 h和36 h时,使用倒置荧光显微镜采集图片,经Image J软件分析划痕面积并计算伤痕愈合率。伤痕愈合率($\%$)=(1-36 h的细胞划痕面积/0 h的细胞划痕面积) $\times 100\%$ 。

1.4.7 Transwell迁移和侵袭实验 根据预实验结果选择36 h作为该实验的药物作用时间,迁移实验过程如下,取对数生长期的4T1细胞经胰酶消化、PBS重悬,配成细胞浓度为 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液。取0.5 mL接种于Transwell小室(孔径为8.0 μm)的上室内,分别向各上室内加入1 mL含free THP、free VRL、free THP/VRL、THP-CSmicelles、VRL-CSmicelles和THP+VRL-CSmicelles的培

养基,其中THP与VRL给药质量浓度均为60 ng/mL,设置对照孔(不给药组)和复孔($n=3$)。向下室中加入2.6 mL高糖DMEM完全培养基(含15%胎牛血清)作诱导剂,继续孵育。36 h后取出小室,除去未穿过纤维膜的细胞,体积分数为4%多聚甲醛固定20 min, PBS洗涤,烘干,0.1%结晶紫溶液浸染20 min, PBS洗净,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干。使用倒置荧光显微镜采集图片,用Image J软件统计细胞数并计算迁移细胞的比例。迁移细胞比例=给药组的迁移细胞数量/对照组的迁移细胞数量。侵袭实验步骤如下,将经4 $^{\circ}\text{C}$ 融化的基质胶,用预冷的无血清无抗培养基稀释,配成溶液(质量浓度为300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。吸取0.8 mL上述基质胶溶液于上室内,37 $^{\circ}\text{C}$ 凝胶2 h后弃去培养基,将4T1细胞接种于上室内(细胞密度为 $2.5 \times 10^5/\text{孔}$),加入上述药物溶液和载药胶束孵育36 h,其余操作同上。侵袭细胞比例($\%$)=给药组的侵袭细胞数量/对照组的侵袭细胞数量 $\times 100\%$ 。

1.5 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用GraphPad Prism 8.0软件绘图并进行统计学分析,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞摄取CS胶束的情况

结果见图1。对照组细胞在2 h和4 h时,没有任何荧光;THP+VRL-CSmicelles组细胞摄取量在2 h和4 h时约为free THP/VRL组的2倍,差异有统计学意义($P < 0.0001$);且4 h THP+VRL-CSmicelles组细胞与2 h比较,摄取量更多($P < 0.0001$)。结果表明CS胶束能显著增强药物的入胞能力。

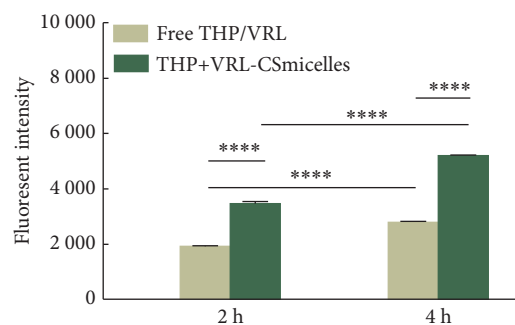


图1 细胞摄取实验结果

Fig 1 The result of cellular uptake assay

**** $P < 0.0001$. $n=3$.

2.2 细胞摄取CS胶束的途径

见图2。4 $^{\circ}\text{C}$ 和叠氮钠抑制组4T1细胞对CS胶束的摄

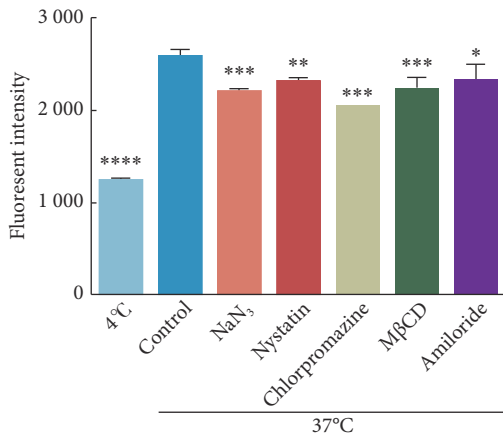


图 2 摄取抑制实验结果

Fig 2 The result of cellular uptake inhibition assay

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, vs. control. $n = 3$.

取量较低,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),提示细胞摄取CS胶束的途径主要为能量依赖性的主动转运。各类抑制剂中,氯丙嗪对CS胶束的摄取抑制作用最强,甲基β-环糊精、制霉菌素有一定的抑制作用,阿米洛利的抑制作用较弱,表明细胞摄取CS胶束的途径主要为网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞作用。

2.3 CS胶束的4T1细胞内高尔基体靶向性

结果见图3。高尔基体(红色荧光)位于细胞核附近,用绿色荧光标记的CS胶束与高尔基体呈明显共定位现象。结果表明CS胶束具有较高的高尔基体亲和性,可被细胞摄取靶向高尔基体。

2.4 THP+VRL-CSmicelles对4T1细胞内高尔基体结构的影响

结果见图4。对照组细胞内的高尔基体位于核周,结构完整;VRL-CSmicelles和THP+VRL-CSmicelles组的高尔

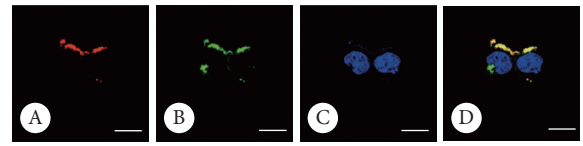


图 3 高尔基体共定位实验结果

Fig 3 The result of Golgi-colocalization experiment

Golgi apparatus (red) in 4T1 cells incubating FITC-labeled CSmicelles for 1 h were stained to determine the distribution of FITC (green). A: Golgi apparatus; B: FITC labeled CSmicelles; C: DAPI; D: Merge. Scale bar: 10 μm.

基体结构发生改变,碎裂成数个小堆叠散布在胞质中;THP-CSmicelles组的高尔基体结构无明显变化。量化结果显示,与对照组比,VRL-CSmicelles和THP+VRL-CSmicelles组的高尔基体碎片数量增加且差异有统计学意义($P < 0.0001$)。结果表明VRL能够解除高尔基体的极性,破坏高尔基体的正常结构。

2.5 THP+VRL-CSmicelles体外抗4T1细胞转移的效果

结果见图5。伤痕愈合实验结果显示,36 h后对照组的伤痕愈合率达(63.15±3.02)%,提示4T1细胞具有较强的运动能力。与对照组比较,各给药组4T1细胞的运动能力均减弱($P < 0.05$);其中THP+VRL-CSmicelles组的伤痕愈合率最低,提示其具有最优的抑制细胞运动的能力,与free THP/VRL组和THP-CSmicelles组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

Transwell迁移和侵袭实验结果显示,36 h后对照组均可见大量肿瘤细胞穿过纤维膜,提示4T1具有较强的细胞迁移/侵袭能力。与对照组比较,给予THP/VRL后迁移/侵袭的细胞数均减少($P < 0.05$);其中THP+VRL-CSmicelles组的迁移/侵袭的细胞数最少,提示其抑制肿瘤迁移/侵袭能力最强,且与free THP/VRL和THP-CSmicelles组比较差

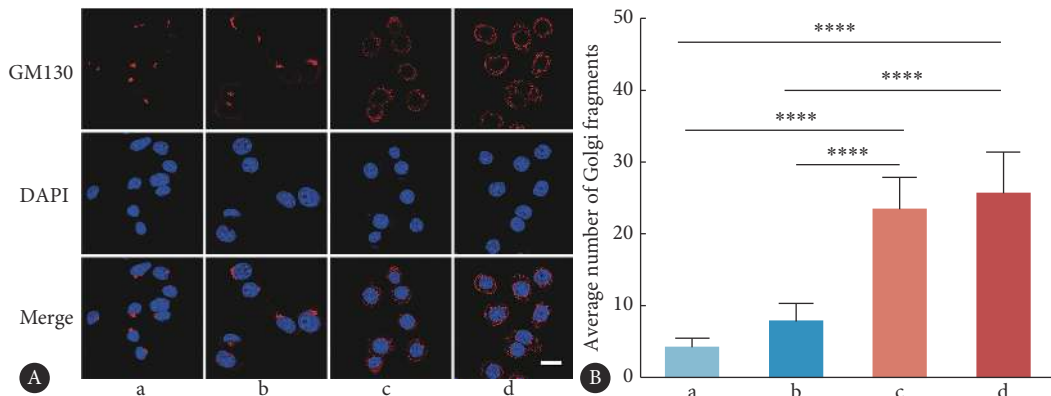


图 4 GM130免疫荧光实验结果

Fig 4 The results of GM130 immunofluorescence experiment

A: Confocal micrographs of cis-Golgi apparatus marked by GM130 (scale bar: 10 μm); B: Average number of Golgi fragments in 4T1 cells treated with different preparations ($n = 30$, **** $P < 0.0001$); a: Control; b: THP-CSmicelles; c: VRL-CSmicelles; d: THP+VRL-CSmicelles.

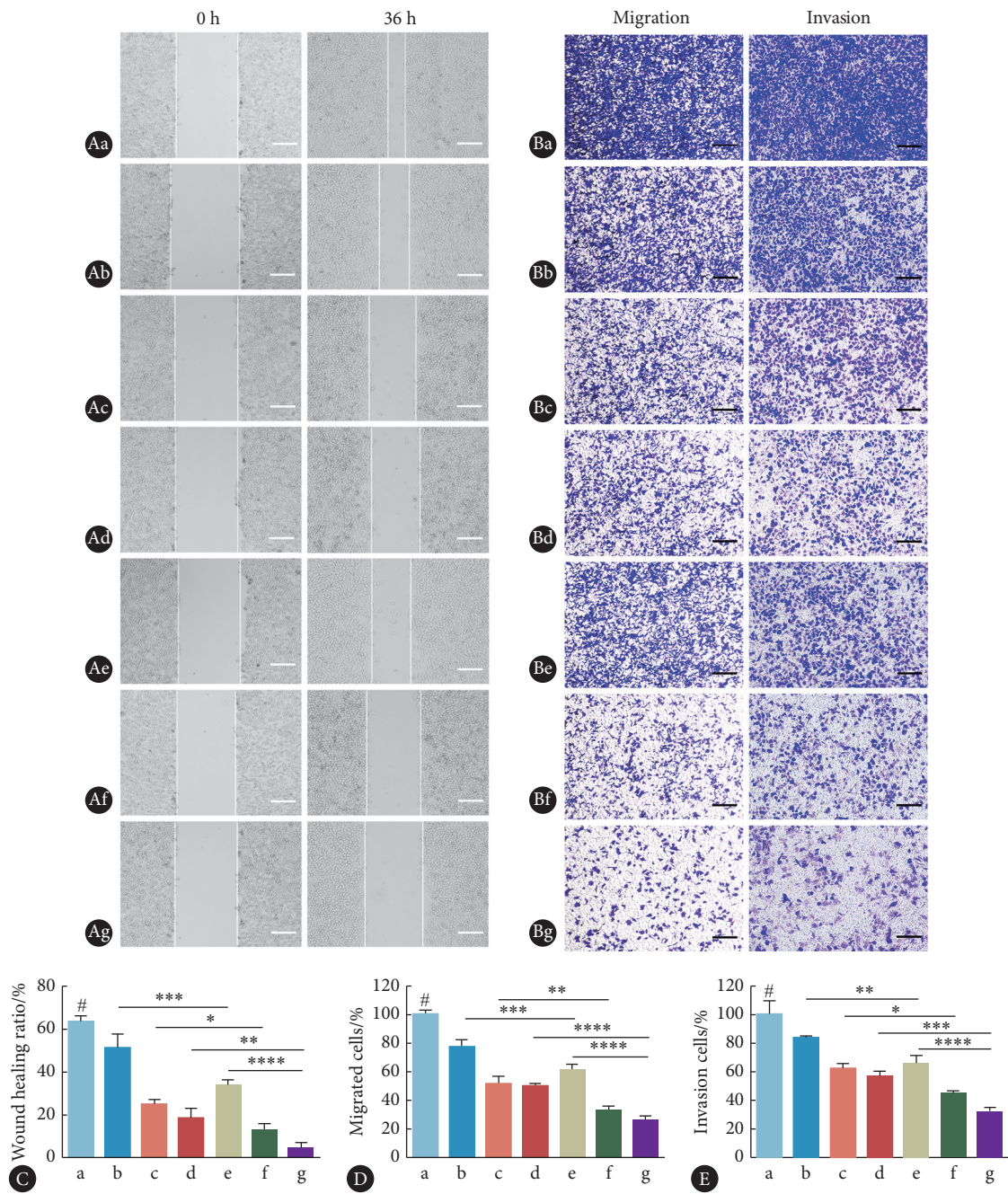


图 5 体外抗肿瘤转移的初步研究结果

Fig 5 Preliminary evaluation of anti-tumor metastasis effect *in vitro*

A: Microscopic images of wound healing assay of 4T1 cells; B: Microscopic images of the migration/invasion of 4T1 cells incubated for 36 h; C: The wound healing ratio of 4T1 cells; D: The percentage of the migration of 4T1 cells; E: The percentage of the migration of 4T1 cells. The scale bars represent 100 μm. a: Control; b: Free THP; c: Free VRL; d: Free THP/VRL; e: THP-CSmicelles; f: VRL-CSmicelles; g: THP+VRL-CSmicelles. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; # $P < 0.05$, vs. the other groups. $n = 3$.

具有统计学意义 ($P < 0.05$), 与伤痕愈合实验结果一致。以上实验结果共同表明 THP+VRL-CSmicelles 具有良好的体外抗肿瘤转移效果。

3 讨论

高尔基体在癌症转移过程中发挥着重要作用, 因此

破坏肿瘤细胞内的高尔基体结构有望抑制肿瘤转移。本研究利用共载 THP/VRL 的 CS 胶束初步研究其肿瘤细胞高尔基体靶向性和体外抗肿瘤转移效果。结果表明该胶束具有较强的肿瘤细胞高尔基体靶向性, 能破坏高尔基体结构, 抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭。

CS 胶束实现肿瘤细胞内的高尔基体靶向需解决几个

难题。首先,CS胶束需具备肿瘤细胞靶向性,多项研究表明CS可与多种肿瘤细胞表面过表达的CD44受体特异性识别并结合,故CS胶束能够靶向肿瘤细胞。其次,CS胶束入胞后如何到达高尔基体?摄取抑制实验结果表明CS胶束存在小窝蛋白介导的入胞途径,且研究发现经小窝蛋白介导的内吞途径入胞后的纳米粒可不经溶酶体直接去往其它细胞器^[22],这为CS胶束靶向高尔基体提供了可能。最后,CS胶束通过何种机制靶向高尔基体?我们实验室前期对CS的靶向机制进行了初步研究,推测该作用是通过N-乙酰氨基半乳糖转移酶介导的^[15]。N-乙酰氨基半乳糖转移酶是高尔基体上的一类酶蛋白,与蛋白质的糖基化修饰有关^[23]。而N-乙酰氨基半乳糖是组成CS二糖结构的重要单元^[14],可与高尔基体上的N-乙酰氨基半乳糖转移酶特异性识别并转移至多肽链上^[24]。所以,CS胶束可以靶向肿瘤细胞内的高尔基体,高尔基体共定位实验结果也说明了这一点。

GM130免疫荧光实验发现THP+VRL-CSmicelles靶向高尔基体后,能破坏高尔基体结构,可能与VRL的微管抑制作用有关^[25]。微管在高尔基体结构自组装过程中发挥重要作用^[26],干扰微管形成过程会使高尔基体结构发生解聚^[27-28]。VRL通过与微管蛋白结合,抑制微管形成^[29],故THP+VRL-CSmicelles能够显著破坏高尔基体的结构。

体外抗转移研究结果表明THP+VRL-CSmicelles能显著抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭,推测原因如下:①THP+VRL-CSmicelles具有4T1肿瘤细胞靶向性,能增加肿瘤细胞内药物的蓄积;②THP+VRL-CSmicelles具有较好的高尔基体靶向性,能将VRL递送至高尔基体,破坏高尔基体结构,进而下调肿瘤转移相关蛋白,抑制肿瘤细胞迁移和侵袭。关于抑制肿瘤转移的具有机制有待深入研究。

综上,THP+VTL-CSmicelles具有肿瘤细胞高尔基体靶向性,可发挥靶向效应,抑制肿瘤细胞转移。我们下一步将对THP+VTL-CSmicelles的体内抗肿瘤转移作用及其抗转移机制进行深入研究。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209–249.
- [2] LIN Q, RONG L, JIA X, *et al.* IFN- γ -dependent NK cell activation is essential to metastasis suppression by engineered Salmonella. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2537.
- [3] LAMBERT A W, PATTABIRAMAN D R, WEINBERG R A. Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 2017, 168(4): 670–691.
- [4] HE Q, GUO S, QIAN Z, *et al.* Development of individualized anti-metastasis strategies by engineering nanomedicines. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(17): 6258–6286.
- [5] WINER A, ADAMS S, MIGNATTI P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: Turning past failures into future successes. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(6): 1147–1155.
- [6] WITKOS T M, LOWE M. Recognition and tethering of transport vesicles at the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 47: 16–23.
- [7] BONCOMPAIN G, WEIGEL A V. Transport and sorting in the Golgi complex: multiple mechanisms sort diverse cargo. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 50: 94–101.
- [8] GOMEZ-NAVARRO N, MILLER E. Protein sorting at the ER-Golgi interface. *J Cell Biol*, 2016, 215(6): 769–778.
- [9] GONZALEZ-AVILA G, SOMMER B, MENDOZA-POSADA D A, *et al.* Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 137: 57–83.
- [10] FREZZETTI D, GALLO M, MAIELLO M R, *et al.* VEGF as a potential target in lung cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(10): 959–966.
- [11] WEN Y, TAN X, WU X, *et al.* Golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) promotes endometrial carcinoma cell invasion and migration by regulating the epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biomark*, 2019, 26(1): 21–30.
- [12] YANG H J, LIU G L, LIU B, *et al.* GP73 promotes invasion and metastasis of bladder cancer by regulating the epithelial-mesenchymal transition through the TGF- β 1/Smad2 signalling pathway. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(3): 1650–1665.
- [13] ZHANG M, MA Y, WANG Z, *et al.* A CD44-targeting programmable drug delivery system for enhancing and sensitizing chemotherapy to drug-resistant cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(6): 5851–5861.
- [14] LI M, SUN J, ZHANG W, *et al.* Drug delivery systems based on CD44-targeted glycosaminoglycans for cancer therapy. *Carbohydr Polym*, 2021, 251: 117103[2021-07-02]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117103>.
- [15] LUO J, ZHANG P, ZHAO T, *et al.* Golgi apparatus-targeted chondroitin-modified nanomicelles suppress hepatic stellate cell activation for the management of liver fibrosis. *ACS Nano*, 2019, 13(4): 3910–3923.
- [16] 陈丹, 周红利, 赵婷, 等. 共载吡柔比星和长春瑞滨混合胶束的构建及其对乳腺癌的治疗研究. *四川大学学报(医学版)*, 2021, 52(4): 612–618.
- [17] MANN S K, CZUBA E, SELBY L I, *et al.* Quantifying nanoparticle internalization using a high throughput internalization assay. *Pharm Res*, 2016, 33(10): 2421–2432.
- [18] EOM H J, CHOI J. Clathrin-mediated endocytosis is involved in uptake and toxicity of silica nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Chem Biol Interact*, 2019, 311: 108774[2021-07-02]. <https://doi.org/10.1016/j.cbi>.

- 2019.108774.
- [19] ZHAO T, CUI L, YU X, *et al.* Entry of sapelovirus into IPEC-J2 cells is dependent on caveolae-mediated endocytosis. *Virology*, 2019, 16(1): 37.
- [20] PERNET-GALLAY K, JOUNEAU P H, BERTRAND A, *et al.* Vascular permeability in the RG2 glioma model can be mediated by macropinocytosis and be independent of the opening of the tight junction. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(4): 1264–1275.
- [21] LI H, ZHANG P, LUO J, *et al.* Chondroitin sulfate-linked prodrug nanoparticles target the Golgi apparatus for cancer metastasis treatment. *ACS Nano*, 2019, 13(8): 9386–9396.
- [22] GUO X, WEI X, CHEN Z, *et al.* Multifunctional nanoplatforms for subcellular delivery of drugs in cancer therapy. *Prog Mater Sci*, 2020, 107[2021-07-02]. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2019.100599>.
- [23] DE LAS RIVAS M, LIRA-NAVARRETE E, GERKEN T A, *et al.* Polypeptide GalNAc-Ts: From redundancy to specificity. *Curr Opin Struct Biol*, 2019, 56: 87–96.
- [24] GOTH C K, TUHKANEN H E, KHAN H, *et al.* Site-specific O-Glycosylation by polypeptide -acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-transferase T2) co-regulates β_1 -adrenergic receptor N-terminal cleavage. *J Biol Chem*, 2017, 292(11): 4714–4726.
- [25] KAMATA H, SADAHIRO S, YAMORI T. Discovery of Inhibitors of membrane traffic from a panel of clinically effective anticancer drugs. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(5): 814–818.
- [26] WU J, DE HEUS C, LIU Q, *et al.* Molecular pathway of microtubule organization at the Golgi apparatus. *Dev Cell*, 2016, 39(1): 44–60.
- [27] ARNETTE C, EFIMOVA N, ZHU X, *et al.* Microtubule segment stabilization by RASSF1A is required for proper microtubule dynamics and Golgi integrity. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(6): 800–810.
- [28] FUCHS Y F, EISLER S A, LINK G, *et al.* A Golgi PKD activity reporter reveals a crucial role of PKD in nocodazole-induced Golgi dispersal. *Traffic*, 2009, 10(7): 858–867.
- [29] LIU H, FU Q, LU Y, *et al.* Anti-tubulin agent vinorelbine inhibits metastasis of cancer cells by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Eur J Med Chem*, 2020, 200: 112332[2021-07-02]. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112332>.

(2021-07-18收稿, 2021-12-14修回)

编辑 余琳