

视黄酸-伊立替康脂质体制备及其抗甲状腺未分化癌体外评价

吕世旭¹, 周毅力¹, 徐逸², 杨帆¹

1. 温州医科大学附属第一医院甲状腺外科, 浙江 温州 325015

2. 温州医科大学附属第一医院药学部, 浙江 温州 325015

[摘要] **目的:**制备视黄酸-伊立替康脂质体(以下称RA-IRI@Lip)并评价其对甲状腺未分化癌(ATC)的体外治疗效果及清除肿瘤干细胞的能力。**方法:**采用薄膜水化法以脂质体为载体联合包载视黄酸(RA)和伊立替康(IRI),获得RA-IRI@Lip,并对其粒径、Zeta电位、包封率及体外释放能力等进行表征。通过溶血实验评价RA-IRI@Lip血液相容性。利用FITC标记脂质体评估细胞摄取效率。通过CCK-8、calcein-AM/PI染色及Transwell实验评价RA-IRI@Lip的体外抗ATC效果,采用联合指数分析RA与IRI的协同效应,并采用流式细胞术检测醛脱氢酶阳性细胞比例及CD133阳性细胞比例。**结果:**RA-IRI@Lip的粒径为 (210.3 ± 5.2) nm,多分散性指数小于0.3,Zeta电位为 $-(13.7\pm 2.3)$ mV,RA和IRI包封率分别为 $(88.1\pm 2.9)\%$ 和 $(86.8\pm 1.6)\%$,且RA-IRI@Lip可显著延缓RA和IRI释放[48 h累积释放量分别为 $(66.2\pm 3.6)\%$ 和 $(77.7\pm 4.1)\%$]。各浓度RA-IRI@Lip溶血率均低于3%,提示具有良好血液相容性,且能被甲状腺未分化癌细胞高效摄取。CCK-8和calcein-AM/PI染色结果显示,RA-IRI@Lip能显著抑制人ATC细胞的活性、促进其死亡,其半抑制浓度显著低于游离IRI组和RA+IRI组(均 $P<0.01$)。RA+IRI组及RA-IRI@Lip组中RA与IRI均呈协同作用(联合指数 <1),且RA-IRI@Lip组协同效应更强。Transwell实验结果显示,RA-IRI@Lip抑制甲状腺癌细胞迁移和侵袭的效果也最为显著。流式细胞术检测结果显示,RA-IRI@Lip能够显著降低醛脱氢酶阳性细胞比例和CD133阳性细胞比例(均 $P<0.01$)。**结论:**成功制备了RA-IRI@Lip,RA和IRI可通过分化-化疗的协同作用有效清除ATC细胞及肿瘤干细胞。



[关键词] 甲状腺未分化癌;肿瘤干细胞;视黄酸;伊立替康;脂质体

[中图分类号] R979.1+9;R945 **[文献标志码]** A

收稿日期(Received):2025-10-25 修改返回日期(Revised):2025-12-12 接受日期(Accepted):2026-04-09 网络预发表日期(Online):2026-06-12

基金项目(Funding):温州市基础性公益科研项目(Y20240036)

第一作者(First author):吕世旭,副主任医师,主要从事甲状腺疾病研究;E-mail:1059647116@qq.com;ORCID:0000-0002-3920-0697

通信作者(Corresponding author):杨帆,主治医师,主要从事甲状腺疾病研究;E-mail:wmuyangfan@qq.com;ORCID:0000-0002-0184-5828

Preparation of retinoic acid and irinotecan co-loaded liposomes and their *in vitro* evaluation against anaplastic thyroid carcinoma

LYU Shixu¹, ZHOU Yili¹, XU Yi², YANG Fan¹ (1. Department of Thyroid Surgery, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325015, Zhejiang Province, China; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325015, Zhejiang Province, China)

Corresponding author: YANG Fan, E-mail: wmuyangfan@qq.com, ORCID: 0000-0002-0184-5828

[**Abstract**] **Objective:** To prepare retinoic acid (RA) and irinotecan (IRI) co-loaded liposomes (RA-IRI@Lip) and evaluate their *in vitro* therapeutic effects against anaplastic thyroid carcinoma (ATC) and their ability to eliminate cancer stem cells (CSCs). **Methods:** RA-IRI@Lip was obtained through the co-encapsulation of RA and IRI within liposomes, using the thin-film hydration method. The particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency, and *in vitro* release profiles of RA-IRI@Lip were characterized. Hemolysis assay was conducted to evaluate blood compatibility. Cellular uptake of FITC-labeled liposomes was assessed. The *in vitro* anti-ATC effects were evaluated by cell counting kit-8 (CCK-8), calcein-AM/PI staining, and Transwell assay. The synergistic effect of RA and IRI was analyzed using the combination index, while flow cytometry was performed to detect the proportions of aldehyde dehydrogenase-positive cells and CD133-positive cells. **Results:** The prepared RA-IRI@Lip had an average particle size of (210.3±5.2) nm, a polydispersity index less than 0.3, and Zeta potential of $-(13.7\pm2.3)$ mV. The encapsulation efficiencies of RA and IRI were (88.1±2.9)% and (86.8±1.6)%, respectively. *In vitro* release studies showed that RA-IRI@Lip significantly delayed the release of both RA and IRI, with 48-h cumulative release rates of (66.2±3.6)% and (77.7±4.1)%, respectively. Hemolysis assays demonstrated that all tested concentrations of RA-IRI@Lip exhibited hemolysis rates below 3%, indicating good hemocompatibility. Liposomes can be efficiently taken up by ATC cells after FITC labeling. CCK-8 and calcein-AM/PI staining demonstrated that RA-IRI@Lip significantly inhibited the viability of ATC cells and promoted cell death, with an IC₅₀ significantly lower than those of the free IRI group and the free RA+IRI group (both $P<0.01$). Combination index analysis demonstrated that both the free RA+IRI group and the RA-IRI@Lip group exhibited synergistic effects (combination index <1), with stronger synergism observed in the RA-IRI@Lip group. Transwell assay results demonstrated that RA-IRI@Lip exerted the most significant inhibitory effect on the migration and invasion of ATC cells. Flow cytometry results showed that RA-IRI@Lip significantly decreased the proportions of aldehyde dehydrogenase-positive cells and CD133-positive cells (both $P<0.01$). **Conclusion:** RA-IRI@Lip was successfully prepared, achieving synergistic effects of differentiation therapy and chemotherapy of RA and IRI, thereby effectively eliminating ATC cells and CSCs.

[**Key words**] Anaplastic thyroid carcinoma; Cancer stem cells; Retinoic acid; Irinotecan; Liposomes

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2026, 55(6): 505-514.]

[缩略语] 甲状腺未分化癌(anaplastic thyroid carcinoma, ATC);视黄酸(retinoic acid, RA);伊立替康(irinotecan, IRI);二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC);二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(distearoyl phosphatidylethanolamine-polyethylene glycol 2000, DSPE-mPEG2000);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI);钙黄绿素-乙酰氧甲酯(calcein-acetoxymethyl ester, calcein-AM);碘化丙啶(propidium iodide, PI);细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK-8);分化抗原 133(cluster of differentiation 133, CD133);藻红蛋白(phycoerythrin, PE);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS);高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC);半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})

ATC 是一种罕见的恶性肿瘤,但具有极高的侵袭性和病死率,患者中位生存期不足 5 个月,2 年和 5 年存活率分别低于 15% 和 7%^[1]。值得注意的是,5%~20% 的分化型甲状腺癌患者可发生去分化,发展为 ATC^[2]。由于 ATC 细胞对碘的摄取能力极低且对化学治疗(简称化疗)敏感性差,放射性碘治疗和常规化疗一般不适用于 ATC 患者^[3]。因此,探索新的 ATC 治疗策略具有重要临床意义。

肿瘤干细胞也称为肿瘤起始细胞,是肿瘤异质性的决定性因素之一,具有自我更新、高致瘤性、侵袭性,并对传统化疗和放射治疗呈抗性。肿瘤干细胞在多种恶性肿瘤的进展、复发和转移中起关键作用^[4]。肿瘤干细胞在恶性程度较高、预后较差的 ATC 中的含量显著高于高分化甲状腺癌,在 ATC 进展及治疗抵抗中发挥重要作用,与患者不良预后相关^[5-7]。因此,针对肿瘤干细胞的肿瘤分化治疗可能是 ATC 治疗的重要策略。

肿瘤分化治疗指通过分化诱导剂促进恶性细胞向更成熟的表型分化,从而降低其干细胞样未分化状态。分化治疗可降低肿瘤干细胞在各种实体肿瘤中的比例,进而提高治疗敏感性,代表性药物为 RA^[8]。RA 作为强大的分化诱导剂,在多种实体瘤的治疗中有效诱导肿瘤干细胞分化并降低其干性^[9-10],与其他化疗药物联合使用能显著提高疗效^[11-12]。近年研究发现,拓扑异构酶 I 抑制剂 IRI 在多种高度侵袭性肿瘤中展现出良好的抗肿瘤活性^[13-14],提示该药物可能对快速增殖、低分化的肿瘤细胞具有潜在敏感性。由于 ATC 细胞也具有高增殖性和强侵袭性,推测 IRI 对 ATC 细胞

具有抑制作用。此外,由于肿瘤干细胞对 IRI 等化疗药物具有较强耐药性,IRI 的抗肿瘤疗效受到限制,而 RA 可通过诱导肿瘤干细胞分化来逆转耐药,从而增强 IRI 的细胞毒性^[15]。因此,RA 和 IRI 联合使用可能通过分化-化疗协同作用同时消灭肿瘤干细胞和肿瘤细胞。

脂质体是基于胆固醇和天然无毒磷脂的球形囊泡,具有良好的生物相容性和低免疫原性,并提供可载药的疏水层和亲水层,能够提高药物稳定性,目前已被广泛用于药物递送。鉴于疏水性 RA 生物利用度低^[16],而亲水性 IRI 较难进入细胞且易降解^[13],本研究拟构建一种同时包载 RA 和 IRI 的脂质体递送系统(以下称 RA-IRI@Lip),并在细胞水平考察 RA-IRI@Lip 对 ATC 的疗效及其对肿瘤干细胞的抑制作用,为其临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和仪器

人正常甲状腺细胞 Nthy-ori3-1 (ml096999)(以下称甲状腺细胞)和人 ATC 细胞 8505C (ml095966)(以下称甲状腺癌细胞)为中国上海酶联生物科技有限公司产品。RA(R106320)、IRI(I127961)、DPPC(D130424)、胆固醇(C104028)、DSPE-mPEG2000(D1520071)为中国上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品;FITC(IF0080)、DAPI(C0065)、calcein-AM/PI 试剂盒(CA1630)为中国北京索莱宝科技有限公司产品;CCK-8(C0038)为中国上海碧云天生物技术股份有限公司产品;ALDEFLUOR 试剂盒(01700)为加拿大 STEMCELL

Technologies 公司产品;CD133-PE 抗体(ab253271)为英国 Abcam 公司产品。透射电子显微镜(FEI Talos F200X)为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;马尔文粒度仪(Zetasizer Nano ZS)为英国 Malvern 公司产品;流式细胞仪(Cytoflex)为美国 Beckman Coulter 公司产品;酶标仪(WD-2102B)为中国北京六一生物科技有限公司产品。

1.2 薄膜水化法制备 RA-IRI@Lip

按照文献[16]中的方法,称取由 DPPC、胆固醇和 DSPE-mPEG2000 按摩尔比 6:3:1 组成的脂质混合物 20 mg,加入 RA(脂质与 RA 质量比为 20:1),并溶解于 1 mL 氯仿/甲醇(体积比 3:1)溶液中。将上述溶液转移至茄形瓶中,通过旋转蒸发仪除去有机溶剂;待旋转蒸发仪上形成一层薄膜后,用 1 mL 1 mg/mL 的 IRI 溶液超声水化洗膜 30 min,即得 RA-IRI@Lip。制备空白脂质体时不添加 RA 至有机溶剂中,并将 IRI 溶液替换为 1 mL 双蒸水,其余步骤同 RA-IRI@Lip 制备。

1.3 表征 RA-IRI@Lip 理化特性

使用透射电子显微镜观察 RA-IRI@Lip 的形态。使用马尔文粒度仪测量空白脂质体和 RA-IRI@Lip 的粒径和 Zeta 电位。

将 RA-IRI@Lip 分别分散于 RPMI-1640 培养基和 PBS 中,于 4 °C 下放置 7 d,每天通过马尔文粒度分析仪检测脂质体的粒径变化及多分散性指数,以评估其稳定性。

1.4 测定 RA-IRI@Lip 的包封率、载药量及体外释放行为

精密量取 RA-IRI@Lip 溶液 1 mL,加甲醇定容至 10 mL,静置过夜,超声 30 min 破乳,然后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,并采用 HPLC 法分别测定 RA 和 IRI 的总量。精密量取 1 mL RA-IRI@Lip 溶液置于透析袋中,精密移取 5% 甲醇 20 mL 作为透析介质,于 25 °C 磁力搅拌(300 r/min)下透析 45 min,取透析介质减压旋蒸至干,加入甲醇定容至 10 mL,超声 30 min 后过 0.22 μm 微孔滤膜,分别测定 RA 和 IRI 的游离量。计算包封率和载药量:包封率=(药物总量-药物游离量)/药物总量×100%;载药量=(药物总量-药物游离量)/载药脂质体总量×100%,其中,载药脂质体总量=脂质混合物质量+IRI 投药量×包封率+RA 投药量×包封率。

将 1 mL RA-IRI@Lip 加入截留分子量为 3000 的

透析袋中,放入 19 mL 含 0.5% 吐温-80 的 PBS 中。将混合物在 37 °C、黑暗环境中以 100 r/min 摇匀。在指定时间点用等量新鲜缓冲液替换 1 mL 培养基。采用 HPLC 法分别测定 IRI 和 RA 的累积释放量。

$$\text{累积释放量}(\%) = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} V_a C_i + V_0 C_n}{M} \times 100\%$$

其中, V_a 为取样体积($V_a=1$ mL), V_0 为释放介质总体积($V_0=20$ mL), C_n 为第 n 次取样时 RA 或 IRI 的浓度, M 为 RA 或 IRI 的总质量。

1.5 溶血实验测定 RA-IRI@Lip 溶血率

参考文献[17],将 800 μL 不同浓度的 RA-IRI@Lip 溶液(50、100、200、400 和 800 μg/mL)加入含有 200 μL 2% 小鼠红细胞悬液的离心管中,同时用 800 μL PBS 作为阴性对照,800 μL 2% Triton X-100 作为阳性对照。将所有离心管于 37 °C 孵育 1 h,2292× g 离心 5 min,收集上清液,使用酶标仪在 540 nm 处测量各样品的吸光度值并拍照,计算溶血率:溶血率=(待测样品吸光度值-阴性对照吸光度值)/(阳性对照吸光度值-阴性对照吸光度值)×100%。

1.6 FITC 标记法检测 RA-IRI@Lip 细胞摄取能力

采用 FITC 代替 IRI 制备 RA-FITC@Lip^[18]。用游离 20 μmol/L FITC 和 RA-FITC@Lip(FITC 等效浓度为 20 μmol/L)处理甲状腺癌细胞 4 h 后进行 DAPI 染色,采用荧光显微镜观察细胞对上述脂质体的摄取能力。

1.7 CCK-8 法检测细胞存活率

评估空白脂质体对正常细胞的安全性实验中,将甲状腺细胞与不同浓度的空白脂质体(按 IRI 等效浓度计算,分别为 0、1、2、5、10、20 μmol/L)共同培养于 96 孔板中,培养 24 h 后更换培养液并加入 10 μL CCK-8 试剂,在 37 °C 下避光孵育 2 h 后使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度值。

评估空白脂质体、RA、IRI、RA+IRI 及 RA-IRI@Lip 对甲状腺癌细胞的毒性作用实验中,将甲状腺癌细胞悬液接种于 96 孔板中,贴壁后分别用溶解于 PBS 中的上述物质处理细胞 24 h(各组给药浓度均按 IRI 等效浓度计算,分别为 1、2、5、10、20 μmol/L)。更换培养液后,加入 10 μL CCK-8 试剂,在 37 °C 下避光孵育 2 h 后使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度值,通过浓度-效应

曲线获得 IC_{50} 值,并通过CompuSyn软件计算药物联合指数。

1.8 calcein-AM/PI染色法观察细胞毒性

将甲状腺癌细胞接种至96孔板中,设置空白对照组(用PBS处理)、空白脂质体组、RA组、IRI组、RA+IRI组及RA-IRI@Lip组,处理24 h后弃去原有培养基,用PBS清洗后加入100 μ L calcein-AM和PI染色液,在37 $^{\circ}$ C下孵育30 min后通过荧光显微镜观察细胞状态。

1.9 Transwell实验观察细胞迁移和侵袭能力

收集各组细胞,将等量细胞悬液(3×10^5 /mL)接种于Transwell上室,其中侵袭实验需预先在上室涂覆基质胶模拟细胞外基质。下室加入含10%胎牛血清的完全培养基作为趋化剂,在37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳条件下培养24 h后移除上室未迁移或侵袭细胞,对穿膜细胞进行固定并使用0.5%结晶紫进行染色,最后于显微镜下随机选取视野拍照并统计细胞数。

1.10 流式细胞术检测肿瘤干细胞标志物

收集各组细胞,使用ALDEFLUOR试剂盒染色,用流式细胞仪分析细胞中醛脱氢酶阳性细胞比例。

收集各组细胞,用预冷的含1% BSA的PBS重悬并调整细胞浓度。首先使用可固定活性染料标记死细胞,经Fc受体阻断剂封闭后,将细胞样本分为两份,分别加入CD133-PE抗体及相应的PE标记同型对照抗体,4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。洗涤后使用流式细胞仪检测各组CD133阳性细胞比例。

1.11 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0.2软件进行统计分析。数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间数据比较采用独立样本 t 检验;多组间数据比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Tukey事后检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

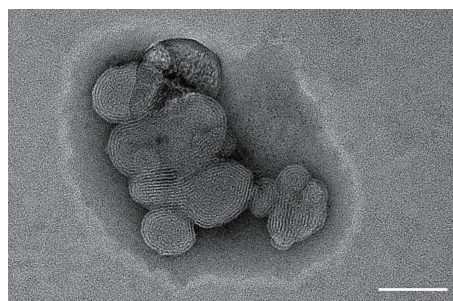
2.1 RA-IRI@Lip的理化特性

成功制备了RA-IRI@Lip。透射电子显微镜观察发现,RA-IRI@Lip具有典型的脂质体双层结构(图1)。空白脂质体和RA-IRI@Lip的粒径分别为(172.5 ± 7.6)nm和(210.3 ± 5.2)nm(图2A、B),Zeta电位分别为 $-(11.5\pm 2.3)$ mV和 $-(13.7\pm 2.3)$ mV。

稳定性考察结果显示,RA-IRI@Lip在PBS和RPMI-1640培养基中放置7 d粒径未发生显著变化(图2C),多分散性指数均在0.3以下。结果提示成功构建了具有良好稳定性的RA-IRI@Lip。

2.2 RA-IRI@Lip的包封率、载药量及药物释放特性

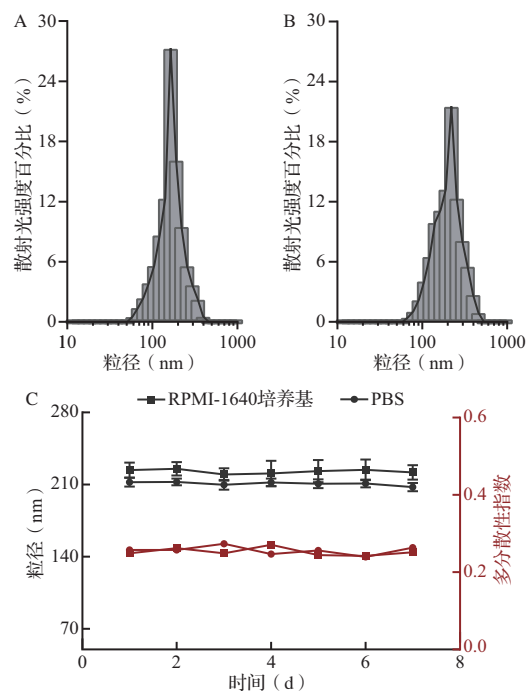
RA和IRI的包封率分别为(88.1 ± 2.9)%和(86.8 ± 1.6)%,载药量分别为(4.29 ± 0.15)%和($4.22\pm$



RA-IRI@Lip具有典型脂质体双层结构. 标尺=200 nm.
RA-IRI@Lip: 视黄酸-伊立替康脂质体。

图1 RA-IRI@Lip电镜图

Figure 1 Transmission electron microscopy image of RA-IRI@Lip

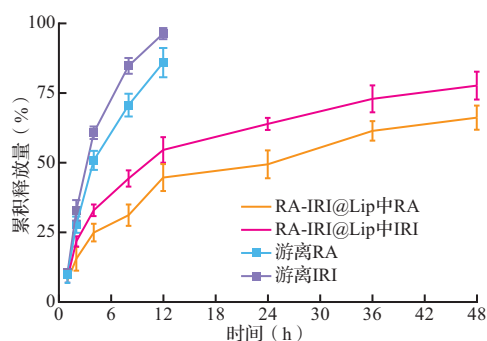


A: 空白脂质体粒径分布; B: RA-IRI@Lip 粒径分布; C: RA-IRI@Lip 在不同溶液中的粒径变化和分散性指数. RA-IRI@Lip: 视黄酸-伊立替康脂质体; PBS: 磷酸盐缓冲液。

图2 RA-IRI@Lip的粒径分布及稳定性

Figure 2 Particle size distribution and stability of RA-IRI@Lip

0.23)%。游离RA和游离IRI在12 h内的累积释放量分别达到(85.9±4.3)%和(96.4±1.6)%,而RA-IRI@Lip中RA和IRI在48 h内的累积释放量分别为(66.2±3.6)%和(77.7±4.1)%,见图3,提示RA-IRI@Lip具有缓释特性。



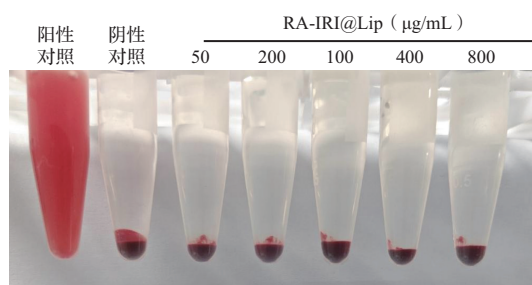
RA: 视黄酸; IRI: 伊立替康; RA-IRI@Lip: 视黄酸-伊立替康脂质体。

图3 游离RA、IRI及RA-IRI@Lip中RA、IRI的释放曲线

Figure 3 Release profiles of RA/IRI from free RA, IRI, and RA-IRI@Lip

2.3 RA-IRI@Lip的生物安全性及细胞摄取效率

在各浓度梯度下,RA-IRI@Lip的溶血率均小于3%(图4)。空白脂质体在各IRI等效浓度梯度下与甲状腺癌细胞孵育24 h,细胞存活率均大于90%。结果提示RA-IRI@Lip具有良好的生物安全性。



RA-IRI@Lip: 视黄酸-伊立替康脂质体。

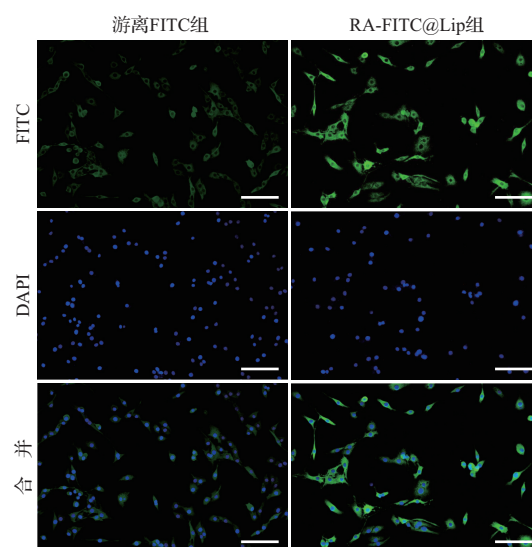
图4 不同浓度RA-IRI@Lip溶血率

Figure 4 Hemolysis rate of RA-IRI@Lip

相较于游离FITC, RA-FITC@Lip组细胞中的绿色荧光显著增强(图5),提示RA-FITC@Lip能够更高效地被甲状腺癌细胞摄取。

2.4 RA-IRI@Lip可以杀伤甲状腺癌细胞

单独使用空白脂质体和RA对甲状腺癌细胞几乎没有毒性作用,而IRI可呈剂量依赖性显著降低细胞存活率,其 IC_{50} 为44.36 $\mu\text{mol/L}$;与游离IRI

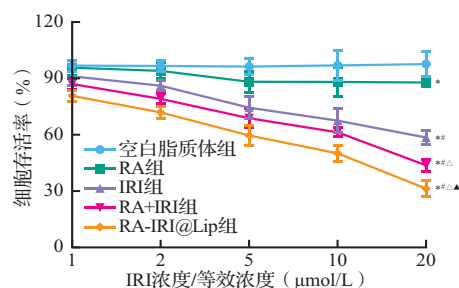


RA-FITC@Lip组中FITC(绿色荧光)较游离FITC组增加。蓝色荧光指示细胞核。标尺=100 μm 。RA-IRI@Lip: 视黄酸-伊立替康脂质体; FITC: 异硫氰酸荧光素; DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶。

图5 甲状腺未分化癌细胞对RA-FITC@Lip和游离FITC的摄取情况

Figure 5 Comparison of the uptake of RA-FITC@Lip and free FITC in anaplastic thyroid carcinoma cells

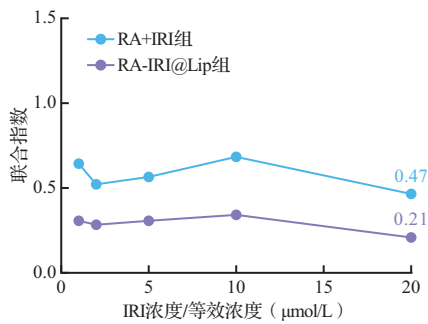
比较,RA+IRI增强了细胞毒性($P<0.01$),其 IC_{50} 降至18.59 $\mu\text{mol/L}$;RA-IRI@Lip对细胞的毒性作用进一步增强($P<0.01$),其 IC_{50} 为6.96 $\mu\text{mol/L}$ 。见图6。RA+IRI组和RA-IRI@Lip组在不同浓度梯度下的联合指数均小于1,表现为协同作用;与RA+IRI组比较,RA-IRI@Lip组的联合指数更低,提示RA与IRI共载于脂质体后的协同作用更强。见图7。在设定的浓度范围内,IRI等效浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 时,RA-IRI@Lip组联合指数最低(0.21),



与空白脂质体组比较, $^*P<0.01$; 与RA组比较, $^{\#}P<0.01$; 与IRI组比较, $^{\Delta}P<0.01$; 与RA+IRI组比较, $^{\blacktriangle}P<0.01$ 。RA: 视黄酸; IRI: 伊立替康; RA-IRI@Lip: 视黄酸-伊立替康脂质体。

图6 各组甲状腺未分化癌细胞存活率比较

Figure 6 Comparison of anaplastic thyroid carcinoma cells viability among groups



RA: 视黄酸; IRI: 伊立替康; RA-IRI@Lip: 视黄酸-伊立替康脂质体。

图7 RA+IRI 和 RA-IRI@Lip 作用于甲状腺未分化癌细胞联合指数

Figure 7 Combination index values of RA+IRI vs. RA-IRI@Lip in anaplastic thyroid carcinoma cells

表明在该浓度下协同作用最强,因此后续实验选择 IRI 浓度/等效浓度为 20 μmol/L。

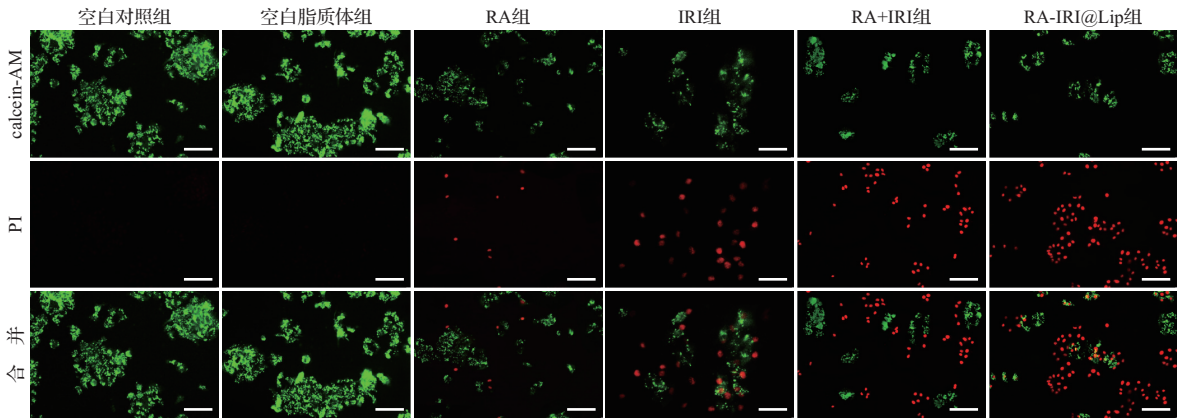
calcein-AM/PI 染色结果显示,空白脂质体和

单独 RA 处理不引起甲状腺癌细胞死亡增多,而 IRI 组甲状腺癌细胞死亡数增多,活细胞减少; RA+IRI 组甲状腺癌细胞死亡数较 IRI 组显著增多,且 RA-IRI@Lip 组细胞死亡数增加更为显著。见图 8。

结果提示,RA 与 IRI 联合应用可协同增强对甲状腺癌细胞的杀伤作用,且脂质体共递送进一步提高了其抗肿瘤细胞活性。

2.5 RA-IRI@Lip 抑制甲状腺癌细胞迁移和侵袭能力

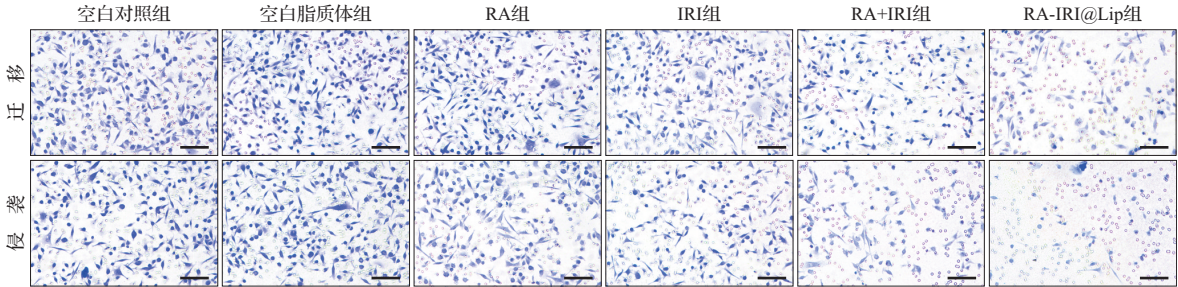
Transwell 实验结果显示,单独使用 IRI 处理虽能抑制细胞迁移和侵袭,但抑制效果相对有限; IRI 与 RA 联用可进一步抑制细胞迁移和侵袭; RA-IRI@Lip 组抑制甲状腺癌细胞迁移和侵袭效果最明显,见图 9 和表 1。提示 RA-IRI@Lip 对甲状腺癌迁移和侵袭的抑制作用较 RA、IRI 单用及联合应用均增强。



空白对照组及空白脂质体组仅见少量死亡细胞,RA 组、IRI 组、RA+IRI 组及 RA-IRI@Lip 组细胞死亡明显增加,其中 RA-IRI@Lip 组细胞死亡最多。标尺=100 μm。calcein-AM: 钙黄绿素-乙酰氧甲酯; PI: 碘化丙啶; RA: 视黄酸; IRI: 伊立替康; RA-IRI@Lip: 视黄酸-伊立替康脂质体。

图8 各组甲状腺未分化癌细胞 calcein-AM/PI 染色情况

Figure 8 Calcein-AM/PI staining in anaplastic thyroid carcinoma cells in each group



RA 组、IRI 组、RA+IRI 组及 RA-IRI@Lip 组细胞迁移数和侵袭数下降,其中 RA-IRI@Lip 组细胞迁移数和侵袭数下降最明显。标尺=100 μm。RA: 视黄酸; IRI: 伊立替康; RA-IRI@Lip: 视黄酸-伊立替康脂质体。

图9 各组甲状腺未分化癌细胞 Transwell 实验结果

Figure 9 Comparison of the migration and invasion of anaplastic thyroid carcinoma cells among six groups

2.6 RA-IRI@Lip抑制甲状腺癌细胞肿瘤干细胞样特征

与空白对照组[(13.0±0.7)%]比较,空白脂质体或IRI对甲状腺癌细胞中醛脱氢酶阳性细胞比例均无显著影响[分别为(13.6±0.9)%、(12.7±1.1)%,均 $P>0.05$];游离RA和RA+IRI均能减少甲状腺癌细胞醛脱氢酶阳性细胞比例[分别为(7.7±0.3)%和(7.4±0.3)%,均 $P<0.01$];RA-IRI@Lip相比游离RA或RA+IRI进一步减少甲状腺癌细胞醛脱氢酶阳性细胞比例[(5.4±0.3)%, $P<0.01$],见图10A。

与空白对照组[(12.4±0.5)%]比较,空白脂质体或IRI对甲状腺癌细胞中CD133阳性细胞比例均无显著影响[分别为(12.1±0.7)%、(11.3±0.5)%,均 $P>0.05$];游离RA和RA+IRI均能减少甲状腺癌细胞CD133阳性细胞比例[分别为(7.7±0.4)%和(6.7±0.3)%,均 $P<0.01$];RA-IRI@Lip相比RA或RA+IRI进一步减少甲状腺癌细胞CD133阳性细胞比例[(5.3±0.2)%,均 $P<0.01$],见图10B。

上述结果提示RA-IRI@Lip对甲状腺癌细胞肿瘤干细胞样特征具有更强的抑制作用。

3 讨论

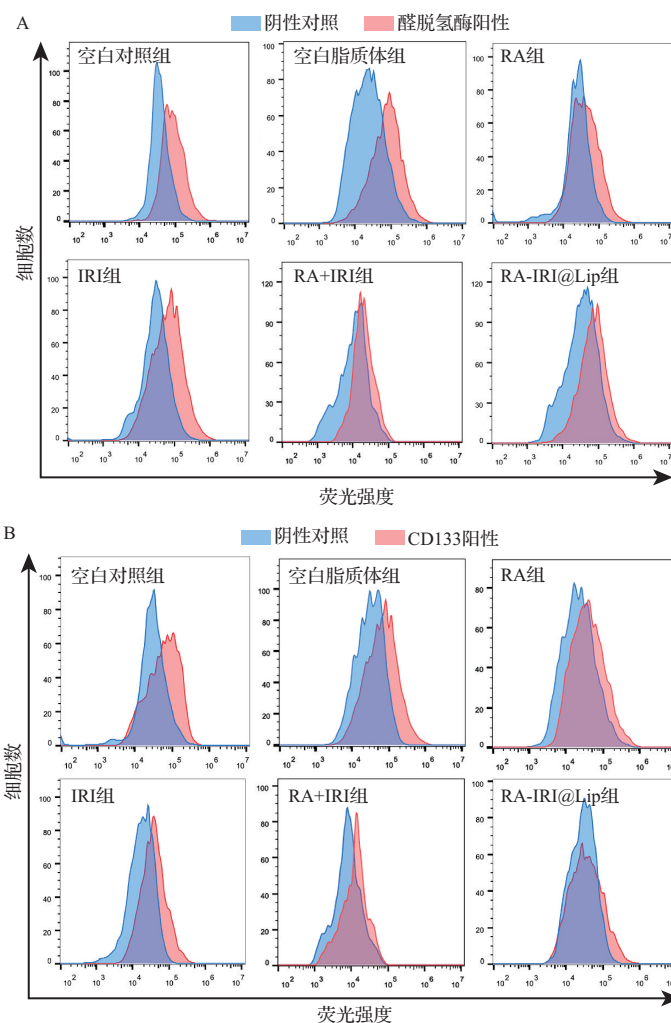
RA是一种在氧气、酸性环境和光照下不稳定的疏水化合物^[19],口服易代谢降解,生物利用度低,因此需借助药物递送系统提升其稳定性和生物利用度^[20]。亲水性IRI因其结构特点较难进入细胞中发挥作用。为了克服以上问题,本研究将两种药物包裹在脂质体中制备成药物递送系统。在制备过程中,疏水性RA首先与脂质化合物结合被包封在脂质双层疏水区域,再将亲水性的IRI结合入脂质体中,IRI被包裹在亲水内部核心中。制备的RA-IRI@Lip粒径为(210.3±5.2)nm,电位为-(13.7±2.3)mV,符合典型脂质体的基本特征,具有良好的稳定性和药物释放能力,且生物安全性良

表1 各组甲状腺未分化癌细胞迁移数和侵袭数比较

Table 1 Comparison of migration and invasion ability of anaplastic thyroid carcinoma among six groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
空白对照组	208.0±8.2	183.3±10.9
空白脂质体组	209.7±4.1	179.0±5.7
RA组	189.0±2.2	162.0±4.5
IRI组	145.0±2.2**	123.0±5.1**
RA+IRI组	119.3±1.2***	85.3±7.0***
RA-IRI@Lip组	87.0±12.8***##△△	62.3±2.5***##△

与空白对照组比较,** $P<0.01$;与IRI组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.01$;与RA+IRI组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。IRI:伊立替康;RA:视黄酸;RA-IRI@Lip:视黄酸-伊立替康脂质体。



A: 醛脱氢酶阳性细胞比例; B: CD133 阳性细胞比例。CD133: 分化抗原 133; RA: 视黄酸; IRI: 伊立替康; RA-IRI@Lip: 视黄酸-伊立替康脂质体。

图10 各组甲状腺未分化癌细胞醛脱氢酶阳性细胞比例和CD133阳性细胞比例流式细胞术检测结果

Figure 10 Aldehyde dehydrogenase-positive cell proportion and CD133-positive cell proportion in anaplastic thyroid carcinoma cells across different groups

好。此外,RA-FITC@Lip 组细胞摄取 FITC 显著高于游离 FITC 组,展示了细胞对载药脂质体良好的摄取能力。这一优势主要归因于脂质体的结构特性:脂质双层与细胞膜的脂质成分相似,可通过膜融合或内吞途径高效进入细胞,同时脂质体的纳米粒径和负电位有利于与细胞膜的相互作用。Cristiano 等^[21]使用脂质体保护 RA 免受光降解,并由于其细胞摄取的改善而增强了其对甲状腺癌细胞的抗增殖特性。此外,Zhang 等^[22]通过将 IRI 和脂肪酸结合增加其亲脂性,使得 IRI 在细胞内积累率更高,细胞毒性也更强。负载 IRI 的脂质体已经进入临床试验,可显著改善胰腺导管腺癌、胆道癌等患者的预后^[23]。

本文资料显示,虽然 IRI 对甲状腺癌细胞也具有细胞毒性,但 RA-IRI@Lip 对甲状腺癌细胞的细胞毒性更为突出。与此同时,RA-IRI@Lip 对甲状腺癌细胞迁移及侵袭能力的抑制十分显著,这对于治疗具有高度侵袭性的 ATC 具有重要意义。其效应增强一方面可能归因于脂质体提高了细胞对药物的摄取,且赋予药物缓释能力,延长作用时间;另一方面可能归因于 RA 对肿瘤干细胞的抑制作用进而减弱细胞对 IRI 的耐药性。值得注意的是,RA 和 IRI 包裹在脂质体中联合处理抑制细胞活性的联合指数小于 1,且小于 RA 和 IRI 游离状态下联合用药的联合指数,说明载药脂质体可能通过提高药物在细胞内的浓度和作用时间促进了 IRI 与 RA 协同抗 ATC 的作用。Azarifar 等^[24]使用脂质体实现 RA 和 5-氟尿嘧啶的协同作用提高抗结肠癌的能力。本文资料显示,RA-IRI@Lip 也能减少肿瘤干细胞含量。由此可见,脂质体不仅增加药物摄取和细胞毒性,还提高了分化-化疗的协同作用,有助于同时消灭 ATC 细胞和肿瘤干细胞。

综上,本研究制备的 RA-IRI@Lip 可通过增强分化-化疗协同作用有效抑制 ATC 细胞及肿瘤干细胞,具有良好的抗 ATC 应用前景。但是,本文资料主要集中于细胞水平对载药脂质体的评估,未涉及其在体内的治疗效果及药代动力学等方面的研究。未来将通过体内实验进一步探讨 RA-IRI@Lip 治疗 ATC 的潜力。

本文附加文件见电子版。



致谢 本研究得到温州市基础性公益科研项目(Y20240036)支持

Acknowledgements This study was supported by Wenzhou Basic Public Welfare Research Project (Y20240036)

作者贡献 吕世旭、周毅力、徐逸和杨帆参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释,起草研究论文或修改重要智力性内容。所有作者均已阅读并认可最终稿件,并对数据的完整性和安全性负责。具体见电子版

Author Contributions LYU Shixu, ZHOU Yili, XU Yi and YANG Fan participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

数据可用性 本研究的相关数据可根据合理请求从通信作者(E-mail:wmuyangfan@qq.com)处获得

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study can be accessed upon reasonable request from the corresponding author at wmuyangfan@qq.com

医学伦理 本研究不涉及人体或动物实验

Ethical Approval This study does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] RAO S N, SMALLRIDGE R C. Anaplastic thyroid cancer: an update[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2023, 37(1): 101678.
- [2] SORRENTI S, CARBOTTA G, DI MATTEO F M, et al. Evaluation of clinicopathological and molecular parameters on disease recurrence of papillary thyroid cancer patient: a retrospective observational study[J]. *Cancers*, 2020, 12(12): 3637.
- [3] ZHANG L, FENG Q, WANG J, et al. Molecular basis and targeted therapy in thyroid cancer: progress and opportunities[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer*, 2023, 1878(4): 188928.

- [4] GUO Q, ZHOU Y, XIE T, et al. Tumor microenvironment of cancer stem cells: perspectives on cancer stem cell targeting[J]. **Genes Dis**, 2023, 11(3): 101043.
- [5] XU T, ZHU C, CHEN J, et al. ISG15 and ISGylation modulates cancer stem cell-like characteristics in promoting tumor growth of anaplastic thyroid carcinoma[J]. **J Exp Clin Cancer Res**, 2023, 42(1): 182.
- [6] YUN J Y, KIM Y A, CHOE J Y, et al. Expression of cancer stem cell markers is more frequent in anaplastic thyroid carcinoma compared to papillary thyroid carcinoma and is related to adverse clinical outcome[J]. **J Clin Pathol**, 2014, 67(2): 125-133.
- [7] LI X, HAN H, YANG K, et al. Crosstalk between thyroid CSCs and immune cells: basic principles and clinical implications[J]. **Front Immunol**, 2024, 15: 1476427.
- [8] BROWN G. Targeting the retinoic acid pathway to eradicate cancer stem cells[J]. **Int J Mol Sci**, 2023, 24(3): 2373.
- [9] HERREROS-VILLANUEVA M, ER T K, BUJANDA L. Retinoic acid reduces stem cell-like features in pancreatic cancer cells[J]. **Pancreas**, 2015, 44(6): 918-924.
- [10] NGUYEN P H, GIRAUD J, STAEDL C, et al. All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth[J]. **Oncogene**, 2016, 35(43): 5619-5628.
- [11] NAJAFZADEH N, MAZANI M, ABBASI A, et al. Low-dose all-trans retinoic acid enhances cytotoxicity of cisplatin and 5-fluorouracil on CD44⁺ cancer stem cells[J]. **Biomed Pharmacother**, 2015, 74: 243-251.
- [12] MALEHMIR M, HAGHPANAH V, LARIJANI B, et al. Multifaceted suppression of aggressive behavior of thyroid carcinoma by all-trans retinoic acid induced re-differentiation[J]. **Mol Cell Endocrinol**, 2012, 348(1): 260-269.
- [13] BROWN M B, BLAIR H A. Liposomal irinotecan: a review as first-line therapy in metastatic pancreatic adenocarcinoma[J]. **Drugs**, 2025, 85(2): 255-262.
- [14] YOO C, HYUNG J, CHAN S L. Recent advances in systemic therapy for advanced intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. **Liver Cancer**, 2023, 13(2): 119-135.
- [15] YASHIRO M, NISHII T, HASEGAWA T, et al. A c-Met inhibitor increases the chemosensitivity of cancer stem cells to the irinotecan in gastric carcinoma[J]. **Br J Cancer**, 2013, 109(10): 2619-2628.
- [16] ISLEK Z, SAGIROGLU A A, UCISIK M H, et al. Experimental design and characterization of dual-antibody-conjugated all-trans retinoic acid-loaded lipid nanoparticles as a potential cancer therapy[J]. **J Drug Deliv Sci Technol**, 2024, 100: 105995.
- [17] ZHANG T, LI N, WANG R, et al. Enhanced therapeutic efficacy of doxorubicin against multidrug-resistant breast cancer with reduced cardiotoxicity[J]. **Drug Deliv**, 2023, 30(1): 2189118.
- [18] WU R, ZHANG Z, WANG B, et al. Combination chemotherapy of lung cancer-co-delivery of docetaxel prodrug and cisplatin using aptamer-decorated lipid-polymer hybrid nanoparticles[J]. **Drug Des Dev Ther**, 2020, 14: 2249-2261.
- [19] TRAPASSO E, COSCO D, CELIA C, et al. Retinoids: new use by innovative drug-delivery systems[J]. **Expert Opin Drug Deliv**, 2009, 6(5): 465-483.
- [20] CUOMO F, Ceglie S, MIGUEL M, et al. Oral delivery of all-trans retinoic acid mediated by liposome carriers[J]. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 2021, 201: 111655.
- [21] CRISTIANO M C, COSCO D, CELIA C, et al. Anticancer activity of all-trans retinoic acid-loaded liposomes on human thyroid carcinoma cells[J]. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 2017, 150: 408-416.
- [22] ZHANG C, JIN S, XUE X, et al. Tunable self-assembly of Irinotecan-fatty acid prodrugs with increased cytotoxicity to cancer cells[J]. **J Mater Chem B**, 2016, 4(19): 3286-3291.
- [23] MILANO G, INNOCENTI F, MINAMI H. Liposomal irinotecan (Onivyde): exemplifying the benefits of nanotherapeutic drugs[J]. **Cancer Sci**, 2022, 113(7): 2224-2231.
- [24] AZARIFAR Z, AMINI R, TANZADEHPANAH H, et al. *In vitro* co-delivery of 5-fluorouracil and all-trans retinoic acid by PEGylated liposomes for colorectal cancer treatment[J]. **Mol Biol Rep**, 2023, 50(12): 10047-10059.

[本文编辑 余 方 刘丽娜]

· 读者 · 作者 · 编者 ·

作者投稿时需提供 ORCID

开放研究者与贡献者身份识别码(open researcher and contributor identifier, ORCID)是由汤森路透和自然出版集团等单位于2009年共同发起创建的,其意义与科学文献领域的数字对象标识符(DOI)类似:DOI为科技文献的身份证,一文一证;ORCID为科研人员的学术身份证,一人一证。本刊作者请先登录<https://orcid.org>,注册后可免费获取 ORCID。