

基于天然IgM新型佐剂的叶酸脂质体疫苗制备及评价

刘安泽, 何盈盈, 王欢, 鲁莹

Preparation and evaluation of folic acid-modified liposomal vaccines based on natural IgM adjuvant

LIU Anze, HE Yingying, WANG Huan, LU Ying

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202401060>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

紫杉醇棕榈酸酯的合成及其脂质体的制备与处方研究

Synthesis of paclitaxel palmitate and the formulation optimization of its liposomes

药学实践与服务. 2024, 42(9): 379-384, 410 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202404062](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202404062)

mRNA肿瘤疫苗非病毒递送系统研究进展

Progress on mRNA tumor vaccine with non-viral delivery system

药学实践与服务. 2025, 43(3): 109-116 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202410034](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202410034)

虎奶菇菌核多糖功能化纳米硒抗疲劳功效研究

Anti-fatigue activity of selenium nanoparticles functionalized by polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* sclerotium

药学实践与服务. 2024, 42(10): 426-432 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202206072](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202206072)

负载骨髓间充质干细胞/白藜芦醇脂质体的水凝胶支架治疗创伤性脑损伤的研究

Hydrogel scaffolds loaded with bone marrow mesenchymal stem cells/resveratrol liposomes for traumatic brain injury treatment

药学实践与服务. 2025, 43(2): 67-74 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202406034](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202406034)

UPLC-MS/MS法测定小鼠血浆中紫杉醇脂肪酸酯前药及其药代动力学研究

Determination and pharmacokinetics investigation of prodrugs of paclitaxel fatty acid esters in mouse plasma by UPLC-MS/MS

药学实践与服务. 2024, 42(8): 341-345 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202404082](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202404082)

山楂酸药理作用的研究进展

Research progress on the pharmacological effects of maslinic acid

药学实践与服务. 2024, 42(5): 185-189 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202307052](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202307052)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

基于天然 IgM 新型佐剂的叶酸脂质体疫苗制备及评价

刘安泽, 何盈盈, 王 欢, 鲁 莹 (海军军医大学药理学系, 上海 200433)

[摘要] 目的 通过天然免疫球蛋白 M(IgM)体内功能化策略, 提高脂质体疫苗的抗原靶向递呈效率、增强免疫应答。方法 薄膜分散法制备叶酸脂质体, 负载模型抗原卵清蛋白, 构建叶酸脂质体疫苗(FA-sLip/OVA)。酶联免疫吸附法(ELISA)考察脂质体疫苗与 IgM 的结合能力。用 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定脂质体疫苗蛋白冠中的 IgM 含量。通过静脉注射途径使小鼠获得免疫, 考察脂质体疫苗的脾脏 B 细胞靶向性及免疫激活作用。结果 叶酸脂质体疫苗平均粒径约 117 nm。ELISA 法验证了叶酸脂质体疫苗与天然 IgM 可以显著结合, 可吸附小鼠血清中的 IgM, 在载体表面形成蛋白冠。静脉注射免疫小鼠能刺激小鼠产生持久的、较高水平的抗体滴度。结论 基于纳米技术成功制备出叶酸修饰的脂质体疫苗, 可在 IgM 的赋能下提高机体免疫应答, 为纳米疫苗研究提供一种新思路。

[关键词] 疫苗; 脂质体; 纳米疫苗; IgM 功能化; 叶酸

[文章编号] 2097-2024(2025)11-0555-05

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202401060

Preparation and evaluation of folic acid-modified liposomal vaccines based on natural IgM adjuvant

LIU Anze, HE Yingying, WANG Huan, LU Ying (School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To increase the antigen presentation and immune response of liposomal vaccines through IgM functionalization strategy. **Methods** Folic acid-modified liposomes loaded with ovalbumin (FA-sLip/OVA) were prepared. The binding ability of liposomal vaccines with IgM was investigated by ELISA method. The IgM in the protein corona was analyzed by SDS-PAGE and Western Blot. Mice were immunized by intravenous injection to investigate the spleen B cell targeting and immune activation of vaccines. **Results** The average particle size of FA-sLip/OVA was about 117 nm. The specific binding between FA-sLip and IgM was verified by ELISA method. Folic acid-modified liposomal vaccines could absorb IgM in mouse serum and form protein coronas on the surface. Intravenous immunization could stimulate mice to produce long-lasting, high-level antibody titers. **Conclusion** Natural IgM-enabled folic acid-modified liposomal vaccines were successfully prepared which could effectively induce immune response and provide a new idea for the research of nano-vaccines.

[Key words] vaccines; liposomes; nano-vaccine; IgM functionalization; folic acid

疫苗的发展有力地降低了全球传染病的病死率和发病率。近年来, 免疫学、分子遗传学和纳米技术的进步推动了疫苗研究的发展。为了进一步提高免疫原性, 纳米疫苗在疫苗学领域的研究中应运而生。纳米疫苗是指大小在几纳米到几百纳米之间的颗粒状的疫苗。研究者根据需求, 确定大小、形状等参数, 把纳米疫苗制作成与免疫系统相似的目标, 从而优化疫苗的生物分布以及与免疫细胞的相互作用, 在疫苗领域展现出巨大的潜力^[1-3]。在疫苗学应用中, 纳米颗粒有 3 个主要功能, 分别是作为佐剂、载体或者呈递平台。可以将这些功能

中的一个或几个相互组合, 以改善免疫反应。纳米颗粒作为颗粒佐剂^[4]和核酸载体^[5]已经取得了显著成功。疫苗开发中的纳米颗粒呈递平台是将抗原负载到颗粒中, 通过增强抗原递呈细胞受体的运输和识别, 促进免疫反应。然而, 纳米疫苗的抗原递呈过程复杂、递送效率低的问题严重限制了其安全性和有效性^[6-7]。因此, 基于纳米疫苗的体内递送过程特点, 开发高效的靶向递送技术, 是助其临床转化的重要环节。

纳米疫苗进入血液后将不可避免地吸附血浆蛋白, 在表面形成蛋白冠。这些被吸收的蛋白质的构象和生物活性会主导纳米疫苗的体内性能^[8-9]。所以, 对生物纳米界面的精确调控为提高纳米疫苗的体内性能提供了新的可能。免疫球蛋白 M(IgM)是个体发育中产生的第一个抗体, 是免疫反应中分泌的第一个抗体, 也是最有效的激活补体系统的免

[基金项目] 国家自然科学基金(82373817)

[作者简介] 刘安泽, 硕士研究生, Email: laz_zz0328@163.com

[通信作者] 王 欢, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 纳米药物设计, Email: wang56855641@163.com; 鲁 莹, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 纳微米制剂研究, Email: acuace@163.com

疫球蛋白之一^[10]。免疫细胞可通过补体受体和 IgM 特异性受体 (FcμR) 与 IgM 结合。结合抗原的 IgM 可以与带有补体受体 CD21/CD35 的 B 细胞相互作用^[11]。同时, FcμR 主要表达在 B 细胞上, 在宿主防御和体液免疫中具有重要作用^[1,13]。由于 IgM-补体-补体受体和 IgM-FcμR 途径都可以参与体液免疫应答, IgM 可能是调节纳米疫苗与免疫细胞相互作用的关键血浆蛋白^[1]。因此, 需要主动操控 IgM 的结合来实现纳米疫苗的精准递送。

脂质体是一类技术成熟的纳米递送系统, 也是一类具有巨大潜力的多功能药物载体^[8]。经多年研究, 脂质体取得了几项重大进展, 如可实现靶向递送、可在体内“隐形化”以实现长循环、可在特定条件下响应等^[14-16]。目前已成功上市的脂质体产品包括用于治疗癌症的 Doxil, DaunoXome, Myocet 及抗真菌治疗的 Ambisome 等^[17-19]。

叶酸分子 (FA) 是 B 族水溶性维生素, 参与机体核苷酸代谢。课题组前期研究发现叶酸可与 IgM 特异性结合^[20-21]。叶酸作为结合 IgM 的靶分子修饰于纳米载体表面, 可显著提高纳米疫苗的抗原递呈效率。

结合以上背景, 本文构建了一种叶酸修饰的脂质体载体, 负载模型抗原卵清蛋白制备成疫苗。通过静脉注射途径给药, 考察叶酸脂质体疫苗通过在体内结合天然 IgM, 并在 IgM 的靶向赋能下, 递呈至脾脏 B 细胞, 刺激机体产生免疫应答能力。

1 仪器与材料

1.1 仪器

R206D 旋转蒸发仪 (上海申生); JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝); Zetasizer nano 马尔文粒径仪 (英国 Malvern); H2050R-1 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪); FLAscent 全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific); Tanon-2500 凝胶成像系统 (上海 Tanon); MQD-A2R 双层控温摇床 (上海旻泉); 超纯水系统 (德国 Sartorius); TCS SP5 II 激光共聚焦显微镜 (德国 leica); DYY-6C 凝胶电泳仪 (六一仪器)。

1.2 试剂与材料

氢化磷脂酰胆碱 (HSPC), mPEG₂₀₀₀-DSPE (上海艾伟拓); PBST 干粉 (上海泰坦); 胆固醇 (CHOL) (上海麦克林); FA-DSPE-mPEG₃₄₀₀ (本实验室合成, HPLC 检测纯度 98.7%); 快速银染试剂盒, TMB 显色液, 封闭液, BCA 蛋白浓度测定试剂盒,

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体, 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (上海碧云天); HRP 标记山羊抗小鼠 IgM 抗体 (Abcam); FITC 标记驴抗小鼠 IgM 抗体 (Jackson Immuno); 牛血清白蛋白 (BSA), 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 Tris-base (国药集团); DiD 荧光素, 卵清蛋白 (OVA, 大连美伦); 高结合力 96 孔酶联免疫吸附法 (ELISA) 板 (Greiner)。

1.3 动物

C57BL/6 小鼠 (雌性, 6~8 周龄, 体重 18~20 g, 杭州子源实验动物科技有限公司, 生产许可证号: SCXK(浙)2019-0004)、BALB/c 小鼠 [雌性, 6~8 周龄, 体重 18~20 g, 上海必凯科翼生物科技有限公司, 生产许可证号: SCXK(沪)2023-0009], 动物实验经过海军军医大学实验动物伦理委员会批准, 并按照动物伦理学要求进行。

2 方法

2.1 叶酸脂质体疫苗的制备与表征

采用薄膜水化法制备叶酸脂质体疫苗。按照表 1, 精密称取处方量的 HSPC, CHOL, DSPE-mPEG₂₀₀₀ 和 FA-DSPE-mPEG₃₄₀₀, 用适量的氯仿溶解混合。减压旋蒸后, 加入 OVA 的生理盐水溶液, 60 °C 水化 1 h, 160 W 探头超声 10 min。超声后置于液氮与 37 °C 水浴反复冻融数次。冻融后采用 10 000 r/min 低温高速离心 30 min, 弃上清液, 并用生理盐水重悬两次。过 0.22 μm 微孔滤膜, 得到叶酸修饰的脂质体疫苗, 命名为 FA-sLip/OVA, 4 °C 保存备用。以相同的方法制备未经叶酸修饰的脂质体疫苗, 命名为 sLip/OVA。马尔文粒径仪测定其粒径、多分散性指数 (PDI) 及 Zeta 电位。

表 1 叶酸脂质体疫苗处方用量 (m/mg)

脂质体疫苗类型	HSPC	CHOL	DSPE-mPEG ₂₀₀₀	FA-DSPE-mPEG ₃₄₀₀	OVA
sLip/OVA	9.58	3.19	3.19	0	5
FA-sLip/OVA	9.58	3.19	2.55	1.125	5

2.2 叶酸脂质体疫苗蛋白浓度及包封率的测定

以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定叶酸脂质体疫苗中 OVA 浓度。方法参考试剂盒说明书, 配制蛋白标准溶液和工作液, 并加至 96 孔板中。取 2 μl 脂质体加至 96 孔板中, 再用 PBS 稀释到 20 μl, 37 °C 孵育 25 min, 每个样品设置 3 个复孔。用酶标仪测定 562 nm 波长处的吸光度。以吸光度值 (A) 和标准溶液浓度绘制标准曲线, 得到标准曲线方程, 将样品吸光度值代入方程可得样品蛋白浓度, 并通过以下公式计算 OVA 的包封率。

$$\text{包封率} = \frac{\text{装载药物量}}{\text{投入药物量}} \times 100\%$$

2.3 叶酸脂质体疫苗与 IgM 结合能力考察

采用 ELISA 法检测叶酸脂质体疫苗与 IgM 的结合能力。50 μl 脂质体铺于高结合力板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。弃去孔内液体, 并用 PBST 洗涤。加入 5% BSA 溶液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育封闭 1 h。加入梯度稀释的 C57BL/6 小鼠血清于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBST 洗涤后加入稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgM 抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBST 洗涤后, 加入 TMB 显色液, 室温避光反应, 15 min 后加入 0.18 mol/L 硫酸终止液。用酶标仪测 450 nm 处的吸光度值(A_{450})。

2.4 IgM 蛋白冠制备及表征

麻醉 C57BL/6 小鼠, 眼眶取血, 收集血清。分别取等体积的叶酸脂质体疫苗与血清至低蛋白吸附管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。加入预冷的 PBS 稀释至 800 μl , 14 000 $\times$ g 低温高速离心 30 min, 收集沉淀。将所得蛋白金属浴 10 min, 取出冷却至室温, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 取出胶板。一方面按照银染试剂盒操作说明进行蛋白银染。另一方面, 继续恒流 400 mA 转膜 25 min。电泳完毕取出 PVDF 膜, 将膜置于封闭液中, 再置于摇床上室温缓慢封闭 1 h。倒尽封闭液, 加入稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgM 抗体, 置于摇床上 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。抗体孵育完后, 用 PBST 快速洗涤。洗涤完成后加入 ECL 发光显色液, 避光反应后用成像仪曝光显色。

2.5 脾脏 B 细胞靶向性考察

按表 1 的处方并加入适量的 DiD 荧光素, 氯仿溶解并成膜。并照“2.1”项下方法制备负载 DiD 的脂质体, 命名为 sLip/DiD 和 FA-sLip/DiD。经尾静脉注射至 BALB/c 小鼠体内, 并于给药 4 h 后收集脾脏。脾脏冷冻切片, DAPI 染核, FITC 标记的 IgM 抗体标记小鼠脾脏边缘 B 细胞, 利用激光共聚焦观察脂质体在脾脏中的分布。

2.6 小鼠免疫刺激及抗体滴度测定

C57BL/6 小鼠随机分为 3 组, 每组 5 只, 分别为 Free OVA、sLip/OVA 和 FA-sLip/OVA。通过静脉免疫, 按 20 μg OVA/只的剂量给药, 7 d 给药 1 次, 共免疫 3 次。小鼠末次免疫接种完成后第 7 天取血, 3 500 r/min 低温离心 15 min, 获得血清。ELISA 法测定小鼠血清中的特异性 IgG 抗体滴度。

3 结果

3.1 叶酸脂质体疫苗的表征

制得未经叶酸修饰的脂质体疫苗(sLip/OVA), 溶液呈白色乳光, 平均粒径约 103.7 nm, 分布良

好。叶酸修饰的脂质体疫苗(FA-sLip/OVA), 溶液呈现淡黄色乳光, 粒径稍有增大, 约 117.2 nm(表 2)。叶酸脂质体疫苗的粒径分布见图 1。

表 2 叶酸脂质体疫苗的粒径及 Zeta 电位表征

	粒径(d/nm)	PDI	Zeta 电位(ζ/mV)
sLip/OVA	103.7 $\pm$ 1.0	0.143 $\pm$ 0.014	-7.387 $\pm$ 0.323
FA-sLip/OVA	117.2 $\pm$ 2.1	0.163 $\pm$ 0.021	-8.023 $\pm$ 0.917

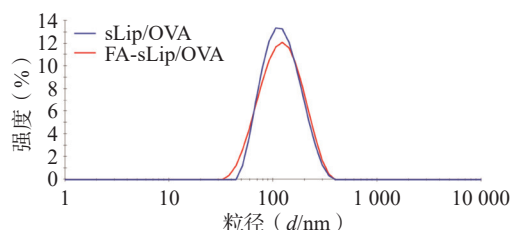


图 1 叶酸脂质体疫苗的粒径分布图

3.2 叶酸脂质体疫苗蛋白含量及包封率的测定

通过 BCA 试剂盒测得的标准曲线方程 $Y=0.221\ 2X+0.110\ 8$, 线性关系良好($r=0.997\ 4$)。经计算可得, FA-sLip/OVA 的 OVA 含量为 1.35 mg/ml, 包封率为 26.94%。sLip/OVA 的 OVA 含量为 1.39 mg/ml, 包封率为 27.76%。

3.3 叶酸脂质体疫苗与 IgM 结合能力考察

脂质体疫苗与血清中 IgM 相互作用结果如图 2 所示, 脂质体通过叶酸修饰, 显著增强了与 IgM 的结合力。

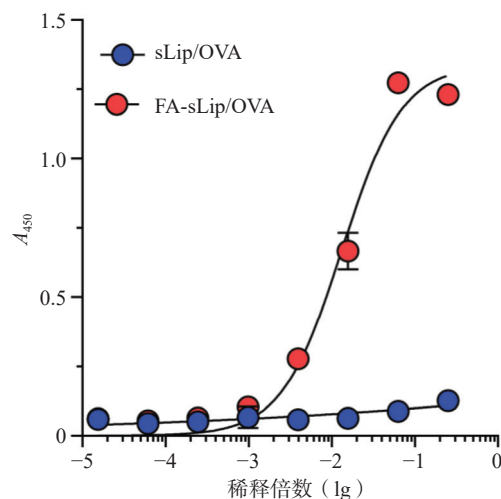


图 2 叶酸修饰的脂质体疫苗与 IgM 的结合力曲线
($n=3$, mean $\pm$ SD)

3.4 天然 IgM 吸附的操控

SDS-PAGE 分析脂质体疫苗与血清孵育得到的蛋白冠, 在分子量约为 72 000 处可见明显的蛋白条带。且 FA-sLip/OVA 组的 IgM 吸附量多于 sLip/OVA 的 IgM 吸附量(图 3A)。Western Blot 同样证实 FA-sLip/OVA 组的 IgM 吸附量多于 sLip/OVA 组的 IgM 吸附量(图 3B)。

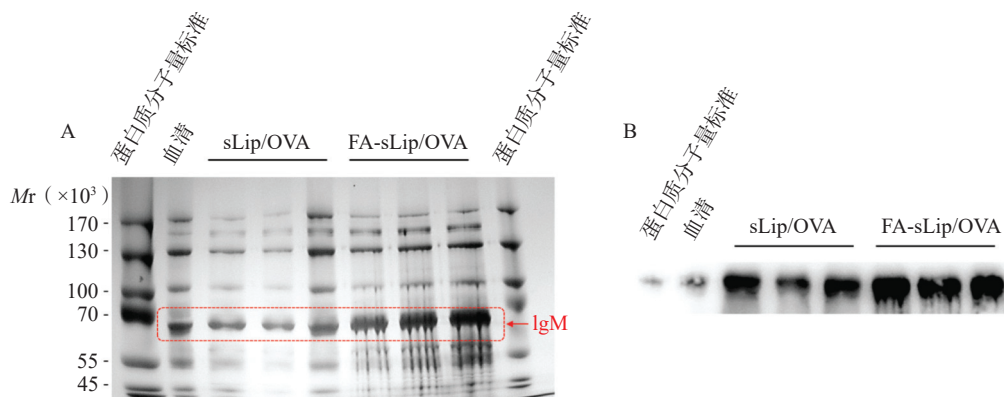


图 3 天然 IgM 与叶酸脂质体疫苗的蛋白冠分析

A: SDS-PAGE 法分离叶酸脂质体蛋白冠的胶图; B: Western Blot 法鉴定叶酸脂质体蛋白冠中的 IgM 成分

3.5 脾脏 B 细胞靶向性考察

图 4 显示了脂质体疫苗在体内对脾脏 B 细胞的初步靶向性。通过激光共聚焦观察小鼠脾脏冷冻切片,观察叶酸脂质体的脾脏内分布,结果显示,叶酸脂质体更多地分布在脾脏的边缘区域(图 4B),与 IgM 抗体标记的脾脏边缘 B 细胞(图 4C)具有较好的重叠(图 4D)。以上结果提示,叶酸脂质体具有良好的脾脏边缘 B 细胞靶向性。

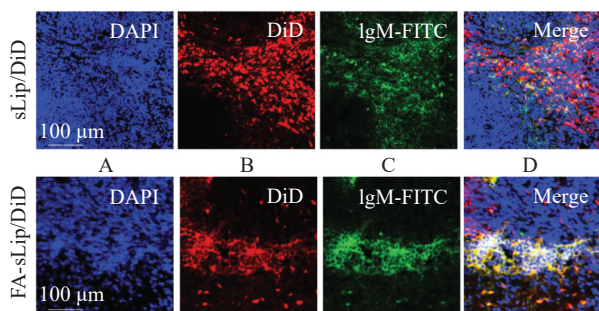


图 4 小鼠脾脏切片的免疫荧光照片

A.蓝色为 DAPI 标记的细胞核;B.红色为负载 DiD 的脂质体;
C.绿色为 IgM-FITC 抗体标记的脾脏边缘 B 细胞;D.黄色
指代被 B 细胞捕获的叶酸脂质体

3.6 血清抗体滴度测定

通过间接酶联免疫吸附测定法检测小鼠血中特异性 IgG 抗体,结果显示如图 5。结果表明脂质体疫苗给药后,能在一定时间内保持较高的抗体滴度。其中,叶酸修饰的脂质体疫苗可以刺激机体产生更高的抗体滴度水平。

4 小结

本实验采用经典的薄膜水化法制备叶酸修饰脂质体疫苗,工艺简便,技术成熟,并采用反复冻融法增加了模型抗原的包封率^[22]。静脉给药后,叶酸脂质体疫苗在血浆中能够特异性结合天然 IgM,并将其吸附于表面形成“蛋白冠”,发挥 IgM 天然佐

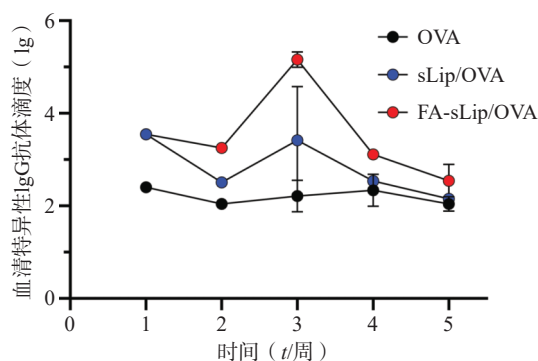


图 5 BALB/c 小鼠血清特异性 IgG 抗体滴度 (n=5, mean±SD)

剂的作用,通过补体受体和 FcμR 途径^[1,11-13],增强了叶酸脂质体疫苗对脾脏 B 细胞的靶向能力,能刺激小鼠产生较为持久的、较高水平的抗体滴度。因此,本文提出的基于天然 IgM 佐剂的叶酸脂质体疫苗,可在 IgM 的靶向赋能下提高机体免疫应答,为纳米疫苗研究提供一种新思路。

【参考文献】

- [1] JIANG Z X, LIU J C, GUAN J, et al. Self-adjuvant effect by manipulating the bionano interface of liposome-based nanovaccines[J]. *Nano Lett*, 2021, 21(11): 4744-4752.
- [2] LACZKÓ D, HOGAN M J, TOULMIN S A, et al. A single immunization with nucleoside-modified mRNA vaccines elicits strong cellular and humoral immune responses against SARS-CoV-2 in mice[J]. *Immunity*, 2020, 53(4): 724-732. e7.
- [3] HUANG Q R, JI K, TIAN S Y, et al. A single-dose mRNA vaccine provides a long-term protection for hACE2 transgenic mice from SARS-CoV-2[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 776.
- [4] WEN R, UMEANO A C, KOU Y, et al. Nanoparticle systems for cancer vaccine[J]. *Nanomedicine*, 2019, 14(5): 627-648.
- [5] ZHANG Y B, SUN C Z, WANG C, et al. Lipids and lipid derivatives for RNA delivery[J]. *Chem Rev*, 2021, 121(20): 12181-12277.
- [6] HU M, LI X, YOU Z, et al. Physiological barriers and strategies of lipid-based nanoparticles for nucleic acid drug delivery[J]. *Adv Mater*, 2024, 36(22): e2303266.

- [7] XU M, QI Y, LIU G, et al. Size-dependent *in vivo* transport of nanoparticles: implications for delivery, targeting, and clearance[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(21): 20825-20849.
- [8] WANG H, LIN S, WU X, et al. Interplay between liposomes and IgM: principles, challenges, and opportunities[J]. *Adv Sci(Weinh)*, 2023, 10(20): e2301777.
- [9] DIGIACOMO L, POZZI D, PALCHETTI S, et al. Impact of the protein *Corona* on nanomaterial immune response and targeting ability[J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2020, 12(4): e1615.
- [10] EHRENSTEIN M R, NOTLEY C A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(11): 778-786.
- [11] SHARP T H, BOYLE A L, DIEBOLDER C A, et al. Insights into IgM-mediated complement activation based on *in situ* structures of IgM-C1-C4b[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(24): 11900-11905.
- [12] LI Y X, SHEN H, ZHANG R X, et al. Immunoglobulin M perception by FcμR[J]. *Nature*, 2023, 615(7954): 907-912.
- [13] WU L P, FICKER M, CHRISTENSEN J B, et al. Dendrimer end-terminal motif-dependent evasion of human complement and complement activation through IgM hitchhiking[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4858.
- [14] MUNSTER P, KROP I E, LORUSSO P, et al. Safety and pharmacokinetics of MM-302, a HER2-targeted antibody-liposomal doxorubicin conjugate, in patients with advanced HER2-positive breast cancer: a phase I dose-escalation study[J]. *Br J Cancer*, 2018, 119(9): 1086-1093.
- [15] LARGE D E, ABDELMESSIH R G, FINK E A, et al. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 176: 113851.
- [16] ANTONIOU A I, GIOFRÈ S, SENECCI P, et al. Stimulus-responsive liposomes for biomedical applications[J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(8): 1794-1824.
- [17] Barenholz Y. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned[J]. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 201, 160(2): 117-134.
- [18] KRAUSS A C, GAO X, LI L, et al. FDA approval summary:(daunorubicin and cytarabine)liposome for injection for the treatment of adults with high-risk acute myeloid leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(9): 2685-2690.
- [19] WANG X C, MOHAMMAD I S, FAN L F, et al. Delivery strategies of amphotericin B for invasive fungal infections[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(8): 2585-2604.
- [20] WANG H, LIN S, WANG S, et al. Folic acid enables targeting delivery of lipodiscs by circumventing IgM-mediated opsonization[J]. *Nano Lett*, 2022, 22(16): 6516-6522.
- [21] WANG H, DING T H, GUAN J, et al. Interrogation of folic acid-functionalized nanomedicines: the regulatory roles of plasma proteins reexamined[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(11): 14779-14789.
- [22] ZHAO Y Z, LU C T. Increasing the entrapment of protein-loaded liposomes with a modified freeze-thaw technique: a preliminary experimental study[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2009, 35(2): 165-171.
- [收稿日期] 2024-01-25 [修回日期] 2024-05-24
[本文编辑] 费永和