

深共熔溶剂通过多种途径抑制肝癌细胞的增殖

俞家伟¹, 方哲钺², 余立权¹, 喻宗繁¹

¹安徽医科大学第二附属医院普外科, 安徽 合肥

²安徽医科大学第二临床医学院, 安徽 合肥

收稿日期: 2025年1月22日; 录用日期: 2025年2月5日; 发布日期: 2025年5月14日

摘要

研究目的: 研究以氯化胆碱(CHCL)和维生素C(VITC)为组成成分所形成的深共熔溶剂(DES)对肿瘤细胞增殖能力的影响研究。**方法:** 用DES混合液处理细胞24 h后, 采用MTT实验检测细胞的增殖能力; 采用凋亡坏死试剂盒检测细胞中的凋亡水平; 采用Western blot检测细胞相关蛋白的表达水平; 采用透射电镜观察DES对细胞的细胞膜及细胞器等各方面的影响。**研究结果:** DES对细胞具有毒性作用; DES促进肝癌细胞的凋亡坏死进而抑制细胞增殖; DES通过抑制PI3K-AKT通路进而抑制细胞的增殖。**研究结论:** 深共熔溶剂可以从多种途径抑制肿瘤细胞的增殖。

关键词

深共熔溶剂, 氯化胆碱, 维生素, 抑制增殖, 肝癌细胞

Deep Eutectic Solvent Can Inhibit the Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells in Many Ways

Jiawei Yu¹, Zhecheng Fang², Liquan Yu¹, Zongfan Yu¹

¹Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui

²The Second School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei Anhui

Received: Jan. 22nd, 2025; accepted: Feb. 5th, 2025; published: May 14th, 2025

Abstract

Objective: To investigate the effect of deep eutectic solvent (DES) formed with choline chloride (CHCL) and vitamin C (VITC) as components on the proliferation ability of tumor cells. **Methods:** After treating the cells with DES mixture for 24 h, the proliferation ability of the cells was detected

文章引用: 俞家伟, 方哲钺, 余立权, 喻宗繁. 深共熔溶剂通过多种途径抑制肝癌细胞的增殖[J]. 药物化学, 2025, 13(2): 136-144. DOI: 10.12677/hjmce.2025.132014

by MTT assay. Apoptosis level was detected by apoptotic necrosis kit. The expression levels of related proteins were detected by Western blot. The effects of DES on cell membranes and organelles were observed by transmission electron microscopy. The results showed that DES had toxic effect on cells. DES promoted apoptosis and necrosis of hepatocellular carcinoma cells and inhibited cell proliferation. DES inhibits cell proliferation by inhibiting PI3K-AKT pathway. Conclusion: Deep eutectic solvent can inhibit the proliferation of tumor cells in many ways.

Keywords

Deep Eutectic Solvent, Choline Chloride, Vitamin, Inhibit Proliferation, Hepatocellular Carcinoma Cells

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

DESs 最初是作为离子液体(ILs)的优先替代品,由 Abbott 于 2003 年首次提出[1],他们团队用尿素和季铵盐合成了第一例低熔点共晶混合物,并揭示了其特性[2]。正是由于 DESs 的这些独特的性质,使其在生物素萃取[3]、药物溶解度增加[4]、金属化合物溶解[5] [6]、催化反应[7]等方面得到了广泛的应用。

DESs 通常由两种或三种廉价且安全的成分组成,这些组分之间能够相互进行关联,并通过形成氢键相互作用,进而形成共晶混合物[8]。在这种混合物中,其中一种化合物充当氢键供体(HBD),而另一种则被视为氢键受体(HBA),它们之间是通过一定摩尔比的混合,在加热搅拌的基础上制备而成的[9]。最后形成的这种共晶混合物的熔点会显著降低,且混合物的熔点相对每个单独组分的熔点来说都要低得多[10],而这种混合物在室温下通常会变成液体[11]。这种转变温度的降低是络合剂和卤化物盐之间的分子间作用力(如氢键和范德华键)造成的,这些相互作用产生了与主要成分完全不同的独特性质的混合物[12]。在 HBD 和 HBA 组分之间存在广泛的氢键网络,以及液相中熵增益的增强,都会导致凝固点的深度降低,进而降低了 DESs 的熔化温度[13]。

DESs 最吸引人的优点之一是其制备过程简单,可以通过加热或研磨来生产,且在形成过程中不会产生任何废物。此外,DESs 还被认为是不易燃、低蒸汽压、高度可调、低毒性、化学和热稳定性高的溶剂。[1]。而与 ILs 和其他常规溶剂相比,DESs 被公认为挥发性低、热稳定性好、可调性强、可生物降解、毒性小、成本低[14],与此同时 DESs 还是化学意义上的可定制溶剂,因为它们可以通过将不同种类的季铵盐(如 ChCl)与不同的氢键供体(HBD)结合进而设计出完全不同的 DESs 从而满足不同的需求。因此,可以制备具有不同物理化学性质(如凝固点、粘度、电导率和 pH 值等)的特定的 DESs [8]。这些优点极大地促进了 DES 的实际应用。另一方面,深层共晶溶剂最大的缺点是它们的高粘度,大多数 DESs 在室温下呈现相对较高的粘度。这主要是由于分子间的相互作用,如氢键、范德华键等分子间作用力,强烈降低了 DESs 的运动性,高粘度导致低离子电导率和阻碍药物扩散,这可能导致体内吸收不足和生物利用度差,这在很大程度上阻碍了 DESs 在制药和生物医学领域的实际应用[1]。为了解决这个问题,我们可以向这样的系统中加入水以降低它们的粘度[15],通过调整加入的水的量进而配制出我们所需要粘度的 DESs,而这恰恰也体现了 DESs 的可调性。水在这个过程中发挥了相当重要的作用,不但可以作为 HBD 提供氢键,更可以降低整个共晶混合物的粘度[16],从而增加 DESs 的适用性。

当氢键受体(HBA)和氢键供体(HBD)的成分来自生物体的代谢物时,例如胆碱衍生物、醇类、糖类、

尿素、有机酸和氨基酸, 这些共熔溶剂被称为天然深共熔溶剂(NADES) [17]。它们完全代表了绿色化学的原则, 被认为是更安全的溶剂, 而 NADES 的作用途径也是多种多样的。据有关报道说, 当以适当的比例混合时, 来自各种生物的许多丰富的初级代谢物的混合物可以形成 NADES, 研究发现很多种物质均可溶于 NADES, 例如一些非水溶性生物活性天然产物如麸质、淀粉、DNA、蛋白质和多糖, 而 NADES 在植物中的存在及其特性表明, NADES 可能参与细胞中各种非水溶性代谢物的生物合成和储存, 并暗示 NADES 在保护生物体免受极端条件影响方面的作用[18]。

NADES 在日常生产生活中有多种应用途径。由于许多药物难以溶于现有溶剂, 我们需要拓宽思路, 寻找其他解决方案。DESs 作为一种新兴的、绿色的、可持续发展的溶剂, 是其中的一个可行方案。除了在生产生活中有着诸多应用之外, 它在药物制作领域的应用也是广泛的, 例如可以用来递送广谱抗菌剂 [19], 可以作为蛋白质的稳定剂[20], 还可以作为脂质药物制剂中的油相[21], 甚至可以用于药物制剂和药物输送应用[22]。而将 DESs 作为本项实验研究目标的主要原因则是 DESs 可以促进某些难溶性药物的溶解, 提高他们的溶解度, 进而增加药物的生物利用度。溶解度这个因素在制药科学和工业中是具有决定性作用的, 从制药的角度来看, 在生产过程中溶解度高的药物活性成分消耗较少溶剂的同时对反应器体积的要求相对来说也是更小的, 从而降低了生产总成本; 此外, 从医学的角度来看, 在人体内, 固体药物必须首先溶解, 然后被血液吸收, 而在这方面, 溶解速度是吸收的关键因素[23]。

2. 材料与实验方法

2.1. DES 的制备

将维生素 C(抗坏血酸)作为氢键受体(HBA), 氯化胆碱作为氢键供体(HBD), 按照 1:2 的摩尔比进行混合。在 400 转/分钟的搅拌速度和 65℃ 的温度条件下充分搅拌混合物, 直至形成均匀透明的液体。随后将混合物静置一段时间, 观察到透明液体无沉淀生成。

2.2. 细胞培养

人肝癌细胞系(Huh-7, HepG2)、人正常肝细胞系(HL-02)在 Dulbecco's Modified Eagle 培养基(DMEM, Life Technologies, Inc., Rockville, MD)中培养, 培养基中添加 10%热灭活胎牛血清(FBS), 1%青霉素和链霉素, 并在 37℃, 5% CO₂ 和 95%饱和湿度的培养箱中培养。为了实验目的, 细胞在指数生长阶段(约 70%~80%)被使用。

2.3. MTT 实验

将肝癌细胞以 3000 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板中, 使其贴壁生长。24 小时后, 将细胞暴露于不同浓度梯度的 DES(浓度范围 0~0.1%), 在 37℃、5%CO₂条件下孵育 24 小时。孵育结束后, 用 PBS 洗去含 DES 的培养基, 每孔加入 10 μL 的 5mg/mL MTT 溶液(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑), 继续孵育 4 小时。随后用 150 μL 异丙醇替代培养基, 溶解甲酰胺晶体, 搅拌约 10 分钟, 避光处理。使用微孔板读取器在 620 nm 和 570 nm 处测量还原 MTT 的光密度, 以评估细胞活力。实验重复三次, 数据以平均值±标准差(SD)表示。活细胞百分率通过处理细胞与对照细胞的吸光度比值计算。此外, IC₅₀值(即导致细胞活力降低 50%的化学物质浓度)通过非线性回归逻辑函数计算得出。

2.4. 细胞形态学分析

将 HL-02、Huh-7 和 HepG2 细胞以每孔 3×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 在 37℃、5% CO₂条件下孵育 24 小时。随后, 用接近 IC₅₀浓度梯度的 DES 处理细胞 24 小时。使用倒置显微镜观察并记录细胞形态变化。

2.5. 凋亡实验

采用 Hoechst 33342 荧光探针标记法检测 Huh-7 和 HepG2 细胞经 DESs 处理 24 小时后的凋亡水平。将细胞以每孔 2×10^4 个细胞的密度接种于 24 孔板中, 在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下孵育过夜。然后用不同浓度的 DESs 处理细胞 24 小时, 加入预配制的细胞染液(每 1 mL 细胞染色缓冲液中加入 5 μL Hoechst 和 5 μL PI), 混匀后在冰浴或 4°C 孵育 20~30 分钟。染色完成后, 用 PBS 洗涤一次, 直接使用荧光显微镜观察并拍照。在该检测方法下, 正常细胞表现为弱蓝色荧光, 凋亡细胞表现为强蓝色荧光。

2.6. 免疫印迹实验

使用 RIPA 裂解缓冲液提取总细胞蛋白, 并采用 BCA 检测试剂盒测定蛋白浓度。随后, 通过 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白, 并将其电泳转移至 PVDF 膜(100 V, 100 分钟)。将膜在 5%BSA 中封闭 1 小时, 然后与特异性一抗孵育过夜(4°C), 一抗包括 PI3K (1:1000)、P-4EBP1 (1:1000)、4EBP1 (1:1000)、AKT (1:1000)、P-AKT (1:1000)及 β -actin (1:2000)。接着, 将膜与相应二抗孵育 1 小时, 并使用增强型化学发光检测试剂进行可视化。在化学发光成像系统(Bio-rad)下检测图像, 并通过 Quantity One v4.6.2 软件进行分析。相对蛋白含量以各蛋白条带与 β -actin 条带的灰度值比值表示

2.7. 透射电子显微镜分析

待细胞准备好后, 吸弃培养基, 用 PBS 将残余培养基洗掉。然后再加入 1 ml PBS, 用无菌细胞刮轻轻刮下细胞, 收集细胞悬液移至 1.5ml 无菌离心管中。 4°C 离心, 3000 rpm, 10 分钟, 离心后缓慢吸弃上清液, 留下试管底部的细胞团块。立即向试管中加入 1 ml 的 2.5%戊二醛, 固定细胞。在经过固定、脱水、浸透、切片、染色后, 在透射电镜下观察, 拍照记录。

2.8. 统计分析

使用 GraphPad Prism 9 软件进行数据统计分析。所有数据以均数 $\pm$ 标准差(SD)汇总。两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 事后多重比较采用 Tukey 多重比较检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

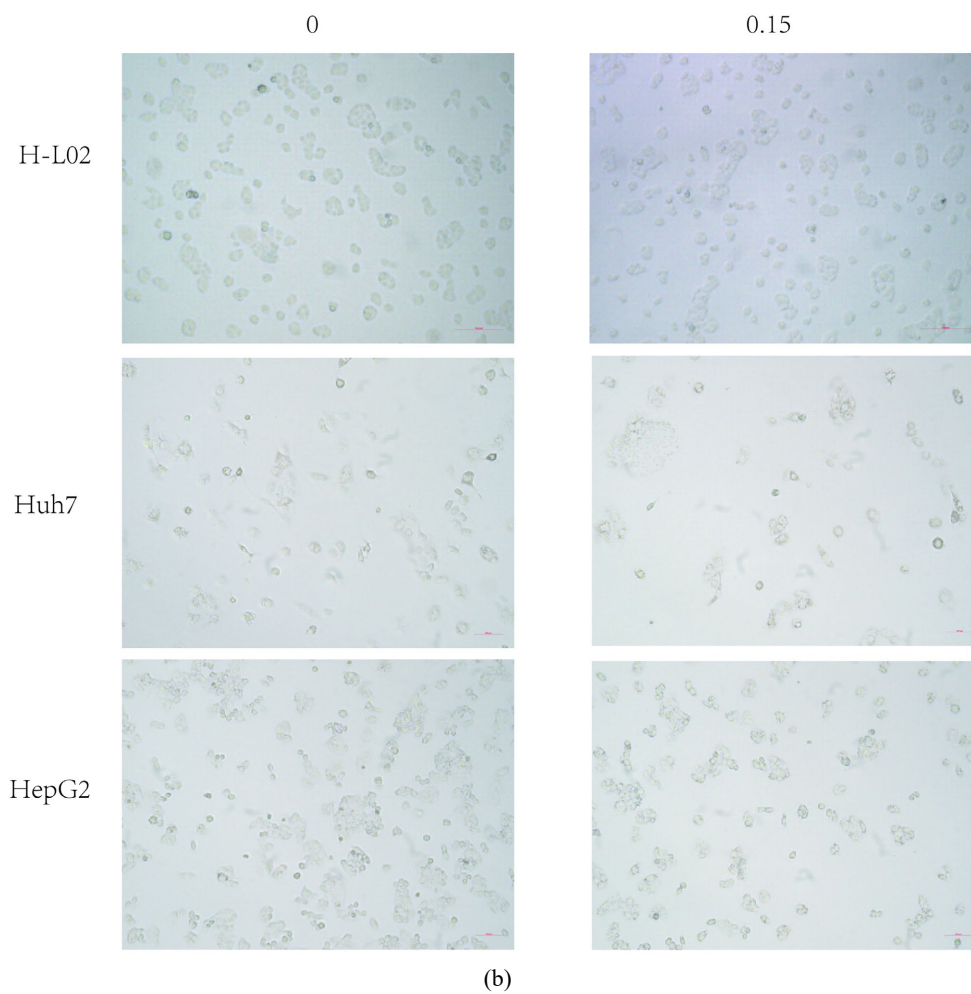
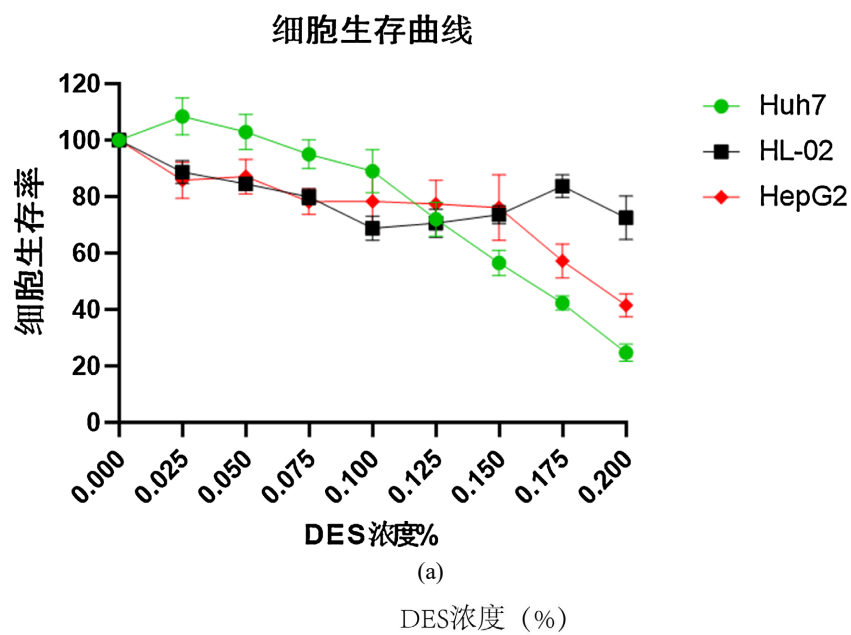
3. 结果

3.1. DES 对细胞具有毒性作用

通过实验, 我们评估了 DES 对正常肝细胞和肝癌细胞的毒性作用。如图 1(a)所示, DES 处理过后, 正常肝细胞所受到的影响较小, 而肿瘤细胞受到的抑制作用较大, 且随着 DES 浓度的增加, 抑制的效果也在逐渐加强。同时我们可以发现, 肝癌细胞的种类不一样, 所受到的影响也不一样, Huh7 受到的抑制作用要大于 HepG2。

DES 处理过后, 细胞的形态也会发生变化, 如图 1(b)我们可以看到, DES 处理过后的三种细胞形态都发生了一定的变化, 且细胞的数量也有所变化。未处理的对照细胞呈单层生长, 附着在培养皿底部; 经 DESs 处理 24 小时后, 肝癌细胞 Huh-7 和 HepG2 逐渐失去正常形态, 细胞缩小、变圆, 甚至出现细胞破裂和坏死。相比之下, DESs 对人正常肝细胞 HL-02 的影响较小, 细胞大多保持典型的正常形态。

为了进一步确认 DES 抑制肿瘤细胞增殖作用的机制, 我们对 DES 处理过后的细胞进行电镜分析。如图 1(c)我们可以看到, 在未经 DES 处理的正常和肝癌细胞中, 线粒体通常具有双层膜结构, 内膜有清晰的嵴, 形态饱满, 排列规则, 未见显著异常; 而从 DES 处理后的图片来看, Huh-7 细胞的线粒体发生了显著改变, 即线粒体的形态出现肿胀, 体积增大, 内膜嵴结构不再清晰; 且部分线粒体的内膜嵴可能



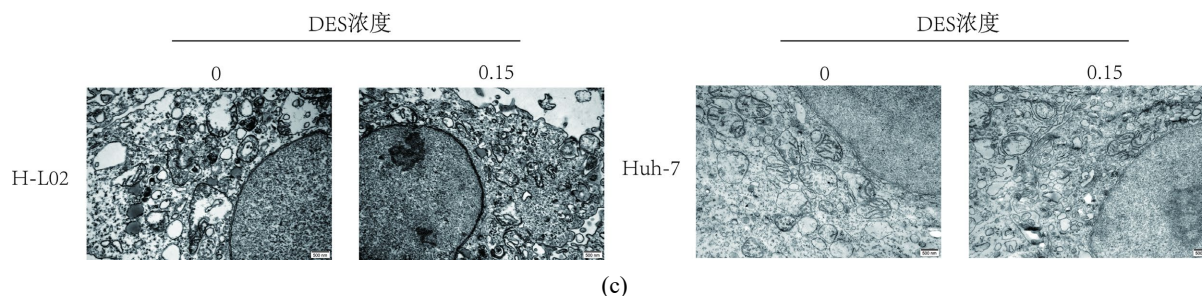


Figure 1. Toxic effects of DES on normal hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells. (a) DES inhibited the proliferation of tumor cells. (b) Morphological changes of tumor cells after DES treatment, that is, cell shrinkage, roundness, and even cell rupture and necrosis. (c) The cells treated with DES showed obvious swelling, necrosis and vacuole formation under electron microscope.

图 1. DES 对正常肝细胞和肝癌细胞的毒性作用。(a) DES 抑制了肿瘤细胞的增殖能力；(b) DES 处理过后的肿瘤细胞形态学发生变化，即细胞缩小、变圆，甚至出现细胞破裂和坏死；(c) DES 处理过后的细胞在电镜下各细胞器发生了明显的肿胀、坏死、空泡形成等。

出现断裂或消失，提示线粒体功能受损。还能观察到部分线粒体内部有空泡形成的现象，这可能是细胞应激反应或凋亡的迹象。而在正常肝细胞中可见线粒体只有轻微的肿胀，线粒体的形态大致没有发生改变。

3.2. DES 促进肝癌细胞的凋亡进而抑制细胞增殖

为了探究 DES 抑制肿瘤细胞增殖的机制，我们采用凋亡试剂检测盒检测 DES 处理后肝癌细胞的凋亡能力，采用凋亡试剂盒对 DESs 处理后的 Huh7 和 HepG2 细胞进行染色，并在荧光显微镜下观察(见图 2)。相比对照组而言，DES 处理过后的肝癌细胞中，凋亡细胞的比例在增加(弱蓝色代表正常细胞，强蓝色代表凋亡细胞)。

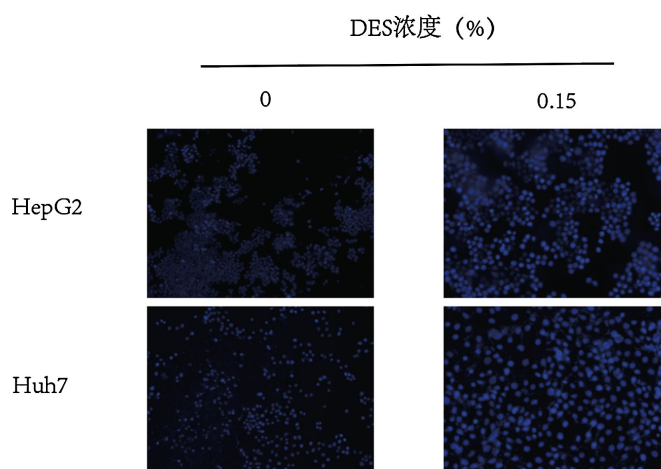


Figure 2. DES promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells and then inhibits cell proliferation. Compared with the control group, the proportion of apoptotic cells increased in liver cancer cells treated with DES (weak blue represents normal cells, strong blue represents apoptotic cells).

图 2. DES 促进肝癌细胞的凋亡进而抑制细胞增殖。相比对照组而言，DES 处理过后的肝癌细胞中，凋亡细胞的比例在增加(弱蓝色代表正常细胞，强蓝色代表凋亡细胞)。

3.3. DES 通过抑制 PI3K-AKT 通路进而抑制细胞的增殖

为探究 DESs 抑制肿瘤细胞增殖的机制，首先研究了 DESs 对 PI3K/AKT 通路的影响。PI3K/AKT 通

路在调控肝癌细胞增殖过程中起着重要作用。如图 3 所示, DESs 处理显著改变 PI3K/AKT 通路相关蛋白的表达水平, 结果显示, 在两种肿瘤细胞中, 磷酸化的 4EBP1 和磷酸化的 AKT 表达均下调, 提示 DESs 可能通过影响 PI3K/AKT 通路的下游蛋白, 抑制肿瘤细胞的增殖。

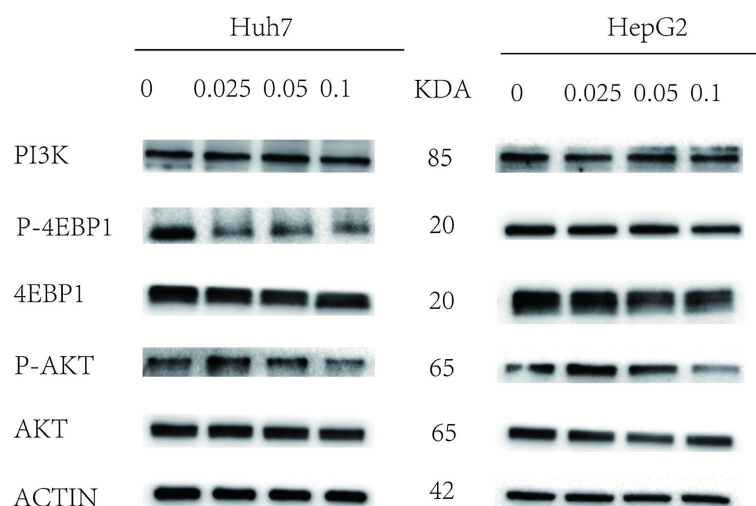


Figure 3. DES inhibits cell proliferation by inhibiting the PI3K-AKT pathway. The expression of phosphorylated 4EBP1 and phosphorylated AKT were down-regulated, suggesting that DESs may inhibit the proliferation of tumor cells by affecting downstream proteins of PI3K/AKT pathway.

图 3. DES 通过抑制 PI3K-AKT 通路进而抑制细胞的增殖。磷酸化的 4EBP1 和磷酸化的 AKT 表达均下调, 提示 DESs 可能通过影响 PI3K/AKT 通路的下游蛋白, 抑制肿瘤细胞的增殖。

4. 结论

本次实验以人肝细胞系作为体外模型, 探究以氯化胆碱和抗坏血酸为组分所形成的 DES 对正常肝细胞和肝癌细胞的影响。通过本实验我们可以发现 DES 对肝癌细胞具有一定的毒性作用, 而对正常肝细胞的毒性较小; DES 还可以通过促进肿瘤细胞的凋亡, 进而抑制肿瘤细胞的生长。同时, DES 还可以抑制肿瘤细胞的 PI3K-AKT 增殖通路抑制肿瘤细胞的增殖能力, 进而抑制肿瘤细胞的生长。

基金项目

CXCL12 及其受体 CXCR4 在肝癌 中的表达及与肿瘤浸润性淋巴细胞分布关系和预后分析, 项目编号: 2012038; 安徽医科大学大学生创新创业训练计划, 项目编号: X202310366071。

参考文献

- [1] Liu, Y., Wu, Y., Liu, J., Wang, W., Yang, Q. and Yang, G. (2022) Deep Eutectic Solvents: Recent Advances in Fabrication Approaches and Pharmaceutical Applications. *International Journal of Pharmaceutics*, **622**, Article 121811. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121811>
- [2] Cheng, K., Xu, X., Song, J., Chen, Y., Kan, Z. and Li, C. (2024) Molecular Dynamics Simulations of Choline Chloride and Ascorbic Acid Deep Eutectic Solvents: Investigation of Structural and Dynamics Properties. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **130**, Article 108784. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2024.108784>
- [3] Jovanović, M.S., Krgović, N., Radan, M., Čujić-Nikolić, N., Mudrić, J., Lazarević, Z., *et al.* (2023) Natural Deep Eutectic Solvents Combined with Cyclodextrins: A Novel Strategy for Chokeberry Anthocyanins Extraction. *Food Chemistry*, **405**, Article 134816. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134816>
- [4] Javed, S., Mangla, B., Sultan, M.H., Almoshari, Y., Sivadasan, D., Alqahtani, S.S., *et al.* (2024) Pharmaceutical Applications of Therapeutic Deep Eutectic Systems (THEDES) in Maximising Drug Delivery. *Heliyon*, **10**, e29783. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29783>

- [5] Li, Y., Sun, M., Cao, Y., Yu, K., Fan, Z. and Cao, Y. (2024) Designing Low Toxic Deep Eutectic Solvents for the Green Recycle of Lithium-Ion Batteries Cathodes. *ChemSusChem*, **17**, e202301953. <https://doi.org/10.1002/cssc.202301953>
- [6] Lai, Z.Y., Yiin, C.L., Lock, S.S.M., Chin, B.L.F., Zauzi, N.S.A. and Sar-ee, S. (2023) A Review on Natural Based Deep Eutectic Solvents (NADESs): Fundamentals and Potential Applications in Removing Heavy Metals from Soil. *Environmental Science and Pollution Research*, **30**, 116878-116905. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26288-8>
- [7] Arnodo, D., De Nardo, E., Ghinato, S., Baldino, S., Blangetti, M. and Prandi, C. (2023) A Mild, Efficient and Sustainable Tetrahydropyranlation of Alcohols Promoted by Acidic Natural Deep Eutectic Solvents. *ChemSusChem*, **16**, e202202066. <https://doi.org/10.1002/cssc.202202066>
- [8] Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S. and Jérôme, F. (2012) Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications. *Chemical Society Reviews*, **41**, 7108-7146. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>
- [9] Marchel, M., Cieśliński, H. and Boczkaj, G. (2022) Deep Eutectic Solvents Microbial Toxicity: Current State of Art and Critical Evaluation of Testing Methods. *Journal of Hazardous Materials*, **425**, Article 127963. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127963>
- [10] Aroso, I.M., Silva, J.C., Mano, F., Ferreira, A.S.D., Dionísio, M., Sá-Nogueira, I., *et al.* (2016) Dissolution Enhancement of Active Pharmaceutical Ingredients by Therapeutic Deep Eutectic Systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **98**, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.002>
- [11] Chen, C., Yu, M. and Liaw, Y. (1997) Epidemiological Characteristics and Risk Factors of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **12**, S294-S308. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1997.tb00513.x>
- [12] Mbous, Y.P., Hayyan, M., Wong, W.F., Hayyan, A., Looi, C.Y. and Hashim, M.A. (2020) Simulation of Deep Eutectic Solvents' Interaction with Membranes of Cancer Cells Using COSMO-RS. *The Journal of Physical Chemistry B*, **124**, 9086-9094. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c04801>
- [13] Kaur, S., Kumari, M. and Kashyap, H.K. (2020) Microstructure of Deep Eutectic Solvents: Current Understanding and Challenges. *The Journal of Physical Chemistry B*, **124**, 10601-10616. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07934>
- [14] Zainal-Abidin, M.H., Hayyan, M., Ngoh, G.C., Wong, W.F. and Looi, C.Y. (2019) Emerging Frontiers of Deep Eutectic Solvents in Drug Discovery and Drug Delivery Systems. *Journal of Controlled Release*, **316**, 168-195. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.09.019>
- [15] Bergua, F., Delso, I., Muñoz-Embid, J., Lafuente, C. and Artal, M. (2021) Structure and Properties of Two Glucose-Based Deep Eutectic Systems. *Food Chemistry*, **336**, Article 127717. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127717>
- [16] Abranches, D.O., Silva, L.P., Martins, M.A.R. and Coutinho, J.A.P. (2021) Differences on the Impact of Water on the Deep Eutectic Solvents Betaine/Urea and Choline/Urea. *The Journal of Chemical Physics*, **155**, Article 034501. <https://doi.org/10.1063/5.0052303>
- [17] Zhang, M., Zhang, X., Liu, Y., Wu, K., Zhu, Y., Lu, H., *et al.* (2021) Insights into the Relationships between Physico-chemical Properties, Solvent Performance, and Applications of Deep Eutectic Solvents. *Environmental Science and Pollution Research*, **28**, 35537-35563. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14485-2>
- [18] Hayyan, M., Looi, C.Y., Hayyan, A., Wong, W.F. and Hashim, M.A. (2015) *In vitro* and *in vivo* Toxicity Profiling of Ammonium-Based Deep Eutectic Solvents. *PLOS ONE*, **10**, e0117934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117934>
- [19] Shaw, Z.L., Awad, M.N., Gharehgozlo, S., Greaves, T.L., Haidari, H., Kopecki, Z., *et al.* (2024) Deep Eutectic Solvent Eutectogels for Delivery of Broad-Spectrum Antimicrobials. *ACS Applied Bio Materials*, **7**, 1429-1434. <https://doi.org/10.1021/acsabm.3c00971>
- [20] Tian, Y., Zhu, M., Hu, T. and Liu, C. (2023) Natural Deep Eutectic Solvent—A Novel Green Solvent for Protein Stabilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, **247**, Article 125477. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125477>
- [21] Panbachi, S., Beranek, J. and Kuentz, M. (2024) Hydrophobic Deep Eutectic Solvent (HDES) as Oil Phase in Lipid-Based Drug Formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, **661**, Article 124418. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124418>
- [22] Emami, S. and Shayanfar, A. (2020) Deep Eutectic Solvents for Pharmaceutical Formulation and Drug Delivery Applications. *Pharmaceutical Development and Technology*, **25**, 779-796. <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1735414>
- [23] Zarei, A., Haghbakhsh, R. and Raeissi, S. (2023) Overview and Thermodynamic Modelling of Deep Eutectic Solvents as Co-Solvents to Enhance Drug Solubilities in Water. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **193**, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.10.007>

附 录

中英文缩略词表(Abbreviation)

英文简称	英文全称	中文全称
DES	Deep eutectic solvent	深共熔溶剂
NADES	Natural Deep eutectic solvent	天然深共熔溶剂
THEDES	Therapeutic Deep eutectic solvent	治疗性深共熔溶剂
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase	磷脂酰肌醇激酶
AKT	Protein Kinase B	蛋白激酶 B
4E-BP1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1	真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	噻唑蓝
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	杜氏改良伊戈尔培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
FBS	Fatal bovine serum	胎牛血清
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
TBST	Tris-HCL buffer solution tween	Tris-HCL 吐温缓冲液
WB	Western blotting	蛋白质印迹
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
Tris	Tris Hydroxymethyl Aminoethane	三羟甲基氨基甲烷