

基于DiR脂质体荧光探针验证柴胡“引药入肝”靶向性研究

黄思成^{1,2}, 喻 锐¹, 赵 琼^{1,2}, 刘燕娇¹, 程 欣¹, 侯安国^{1,2*}

1. 云南中医药大学 中药学院, 云南 昆明 650500

2. 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 制备DiR(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide)脂质体荧光探针(DiR-LP),研究柴胡作为引经药对其在小鼠体内分布的影响,初步验证柴胡引药入肝性能。方法 薄膜分散法制备DiR-LP,以包封率为主要指标,通过单因素试验确立DiR-LP最佳处方与制备工艺,并进行表征。30只SPF级昆明种小鼠随机分为5组:对照组、DiR-LP组和柴胡水提液低、中、高剂量(0.5、1.0、2.0 mg·kg⁻¹)+DiR-LP组,柴胡水提液+DiR-LP组小鼠预先连续3 d按10 mL·kg⁻¹体积ig相应的柴胡水提液,对照组和DiR-LP组小鼠ig相同体积的生理盐水;除对照组外,各组小鼠以10 mL·kg⁻¹尾iv DiR-LP,对照组小鼠尾iv相同剂量的生理盐水;利用小动物活体成像仪在不同时间点(4、5、6、8 h)拍照,示踪小鼠体内DiR-LP的分布情况;8 h时经解剖取出心、肝、脾、肺、肾等器官进行拍照,观察各器官的荧光强度。结果 DiR-LP最佳处方与制备工艺:精密称取大豆卵磷脂120 mg、胆固醇12 mg、DiR 0.375 mg于100 mL茄形瓶中,加入10 mL无水乙醇溶解,于40℃恒温水浴中,30 r·min⁻¹旋转减压蒸发1 h,形成均匀透明薄膜;再加入聚山梨酯80 12 mg、溶于纯净水10 mL,于150 r·min⁻¹旋转常压水化1 h后,置于冰水浴中超声10 min(功率100 W),分别过0.45、0.22 μm微孔滤膜整粒3次,即得DiR-LP。制得的DiR-LP包封率为95.2%,粒径为254.1 nm,聚合物分散性指数(PDI)为0.196, Zeta电位-5.21 mV, 14 d内无沉淀或浑浊现象。DiR-LP经尾iv后主要在肝脏中分布,柴胡水提液+DiR-LP组肝脏部位荧光信号明显比DiR-LP组强,且荧光信号强度与柴胡水提液剂量呈正相关。结论 使用薄膜分散法制备的DiR-LP包封率高、粒径适宜、稳定性较好;在小鼠体内,柴胡对DiR-LP具有肝脏导引作用,且与剂量相关,初步验证了柴胡“引药入肝”的肝靶向性。

关键词: 柴胡; 脂质体; DiR; 荧光探针; 肝靶向; 引药入肝; 薄膜分散法; 小动物活体成像

中图分类号: R943; R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)02-0342-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.02.014

Verification of *Bupleurum chinense* "drug introduction into liver" based on DiR liposome fluorescent probe

HUANG Sicheng^{1,2}, YU Kun¹, ZHAO Qiong^{1,2}, LIU Yanjiao¹, CHENG Xin¹, HOU Anguo^{1,2}

1. School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology of University, Kunming 650500, China

Abstract: **Objective** The DiR liposome fluorescent probe (DiR-LP) was prepared to study the effect of *Bupleurum chinense* as a primer on its distribution in mice and verify the liver function of *B. chinense*. **Methods** DiR-LP was prepared by thin film dispersion method, and the optimum formulation and preparation process of DiR-LP were determined by single factor test with the encapsulation rate as the main index. Thirty SPF Kunming mice were randomly divided into five groups: Control group, DiR-LP group and *B. chinense* water extract (BCWE) at low, medium and high doses (0.5, 1.0, 2.0 mg·kg⁻¹)+DiR-LP group. Mice in BCWE+DiR-LP group were ig with the corresponding BCWE at 10 mL·kg⁻¹ volume for three consecutive days in advance. Mice in control group and DiR-LP group were given the same volume of normal saline. Except the control group, mice in each group were given 10 mL·kg⁻¹ DiR-LP by tail iv and the control group were given the same dose of normal saline. The distribution of DiR-LP in mice was traced by using small animal imager at different time points (4, 5, 6, 8 h). At 8 h, organs such as heart, liver, spleen, lung and

收稿日期: 2022-07-28

基金项目: 云南省科技厅-云南中医学院应用基础研究联合专项面上项目(2018FF001(-030)); 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室(2019YGZ03)

第一作者: 黄思成(1998—),男,水族,硕士研究生,研究方向为中药制剂工艺。E-mail: 1057506360@qq.com

*通信作者: 侯安国(1972—),男,教授,硕士生导师,研究方向为中药药剂与新药。E-mail: 1324491101@qq.com

kidney were dissected and photographed to observe the fluorescence intensity of each organ. **Results** The optimum formulation and preparation process of DiR-LP were as follows: 120 mg of soy lecithin, 12 mg of cholesterol and DiR 0.375 mg were accurately weighed in 100 mL nightshade bottle, dissolved in 10 mL of anhydrous ethanol, and then evaporated in a constant temperature water bath at 40 °C for 1 h at 30 r·min⁻¹ to form uniform transparent films. Then polysorbate 80 12 mg was added, 10 mL was dissolved in pure water, and the water was hydrated at 150 r·min⁻¹ under atmospheric pressure for 1 h, then ultrasonic was placed in ice water bath for 10 min (power 100 W), and the whole grain was passed through 0.45 and 0.22 μm microporous filter membrane three times, to obtain DiR-LP. The entrapment efficiency of DiR liposomes was 95.2%, the particle size was 254.1 nm, the PDI was 0.196, the Zeta potential was -5.21 mV, and there was no precipitation or turbidity within 14 days. DiR-LP was mainly distributed in liver after tailing iv. The fluorescence signal in liver of BCWE + DiR-LP group was significantly stronger than that of DiR-LP group, and the intensity of fluorescence signal was positively correlated with the dose of BCWE. **Conclusion** DiR-LP prepared by thin film dispersion method has high encapsulation efficiency, suitable particle size and good stability. In mice, BCWE has liver guiding effect on DiR-LP, which is related to the dose. It verifies the liver targeting of *B. chinense* "introducing drugs into the liver".

Key words: *Bupleurum chinense* DC; liposomes; DiR; fluorescent probe; liver targeting; drug introduction into liver; thin film dispersion method; *in vivo* bioluminescence image

柴胡为伞科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *B. scorzonrifolium* Willd 的干燥根,药性辛、苦,微寒,归肝、胆、肺经,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的功效^[1]。柴胡作为肝经引药具有悠久的历史并长期应用于临床,如龙胆泻肝汤中柴胡舒畅肝胆之气,并引诸药归于肝胆之经。逍遥散中柴胡疏肝解郁,为方中君药,兼引诸药入肝经,主治肝郁血虚脾弱证。现代研究表明柴胡作为引经药可增强大黄-丹参药对改善SD大鼠的肝纤维化疗效^[2],促进姜黄素在大鼠肝脏中的分布^[3]。

DiR (1, 1'-dioctadecyl-3, 3', 3', 3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide) 是1种亲脂性的羧花青荧光染料,其光吸收在近红外区域,具有较大荧光强度,光稳定性好,可穿透动物组织,背景干扰小,适用于动物活体成像的示踪^[4]。但DiR的疏水性较强,限制了其在生物活体内的广泛应用^[5]。脂质体作为一种药物载体,主要由磷脂与胆固醇组成,类似于生物细胞膜结构,具有体内可降解、低免疫原性、保护药物活性基团、延长药物循环时间等优势^[6]。将DiR染料包封于脂质体的疏水双分子层之间,染料分子高度分散,发射荧光信号,随着脂质体在体内不断降解,染料分子被释放进入体液中,分子间较强的 π - π 相互作用及疏水作用致使分子间发生聚集而后荧光完全淬灭。因此,荧光信号即代表脂质体的信号,通过追踪体内荧光即可研究脂质体在体内的转运和分布过程^[7],还可有效克服DiR染料生物利用度低问题。

本研究以制备的DiR脂质体荧光探针(DiR-LP)注射于ig柴胡提取液后的小鼠,利用小动物活体成像仪观察不同时间点各脏器荧光强度,若柴胡

提取液可增强小鼠肝脏部位的荧光强度,则表示柴胡可引导DiR-LP聚集于肝脏部位,则初步验证柴胡“引药入肝”性能,可为柴胡应用于肝靶向制剂提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

BCE224-1CCN 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];EX125DZH 十万分之一天平(奥豪斯仪器有限公司);GT SONIC-P3型超声波清洗机(功率100 W,昆明庆宏实验室设备有限公司);RE212-B 旋转蒸发器(雅马拓科学株式会社);Cary 60 紫外分光光度计(美国安捷伦科技有限公司);90PlusPALS型纳米激光粒度仪(美国布鲁克海文仪器公司);透射电子显微镜(日本Hitachi HT7700);小动物活体成像仪(珀金埃尔默仪器有限公司)。

1.2 药材与主要试剂

柴胡药材购买于云南昆明百草园药材经营部,经云南中医药大学药用植物教研室李亚琼教授鉴定,为伞科植物柴胡 *B. chinense* DC. 的干燥根,符合《中国药典》2020年版规定;大豆卵磷脂(卵磷脂≥90%,上海源叶生物科技有限公司,批号S30869);胆固醇(质量分数95%,上海源叶生物科技有限公司,批号S11040);DiR荧光染料(爱必信生物科技有限公司);聚山梨酯80(北京鼎国生物技术有限责任公司);无水乙醇(分析纯,成都市科隆化学品有限公司);正丁醇、生理盐水等试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

SPF级昆明种小鼠30只,雄性,体质量18~22 g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验

动物生产许可证号 SCXK(京)2019-0010。动物饲养于云南中医药大学动物实验中心,使用许可证 SYXK(滇)K2017-0005,动物实验经云南中医药大学动物实验伦理委员会批准,批号 R-062022002。

2 方法与结果

2.1 DiR-LP与空白脂质体的制备

采用薄膜分散法制备脂质体^[8]。精密称取大豆卵磷脂 120 mg、胆固醇 20 mg、DiR 0.3 mg 于 250 mL 茄形瓶中,加入 10 mL 无水乙醇溶解,于 45 °C 恒温水浴中,30 r·min⁻¹ 旋转减压蒸发 1 h,形成均匀透明薄膜;再加入聚山梨酯 80 60 mg、溶于纯净水 20 mL,于 150 r·min⁻¹ 旋转常压水化 1 h 后,置于冰水浴中超声 15 min(功率 100 W),分别过 0.45、0.22 μm 微孔滤膜整粒 3 次,即得 DiR-LP,于 4 °C 冷藏保存。同法制备不加 DiR 荧光染料的空白脂质体。

2.2 UV测定DiR含量方法的建立^[9]

2.2.1 DiR对照品溶液的制备 精密称取 DiR 2 mg,用无水乙醇定容至 10 mL,得 0.2 mg·mL⁻¹ 的 DiR 对照品溶液,避光 4 °C 保存。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密吸取 DiR 对照品溶液 100、80、60、40、20、10 μL,置于 10 mL 量瓶,用无水乙醇定容至刻度。于 745 nm 波长下测定吸光度(*A*)值,以质量浓度为横坐标,*A* 为纵坐标,得到回归方程 $A = 0.237 C - 0.000 2 (R^2 = 0.999 9)$ 。表明 DiR 在 0.2~2.0 μg·mL⁻¹ 质量浓度与 *A* 值线性关系较好。

2.2.3 方法学考察 吸取同一质量浓度 DiR-LP 溶液,于 745 nm 处重复测定 6 次,结果 *A* 值的 RSD 值为 0.5%,说明仪器精密性良好;分别于 0、20、40、80、160、720 min 在 745 nm 处测定 *A* 值,计算 RSD 为 1.2%,说明 12 h 内样品较稳定;分别精密吸取 1 mL 质量浓度为 2.00、1.20、0.60 μg·mL⁻¹ 的 3 组 DiR-LP 溶液各 3 份,加入空白脂质体溶液 1 mL 超声破乳,并用无水乙醇定容于 10 mL 量瓶中,测量 *A* 值,计算回收率,结果显示该方法的平均回收率为 101.5%,RSD 为 1.2%。

2.2.4 包封率测定 采用有机溶剂萃取法测定^[10]。经预试验,在与 DiR-LP 溶液不互溶的溶剂中,DiR 在正丁醇中溶解性较好,选择正丁醇为萃取剂。取 1 mL DiR-LP,加水饱和正丁醇 2 mL 萃取 2 次洗掉未包载的 DiR,精密吸取下层 DiR-LP 500 μL 转移至 10 mL 量瓶,加无水乙醇超声破乳并定容至刻度,并于 745 nm 处测定 *A* 值(*A*₁),另精密吸取 DiR-LP 500 μL,加无水乙醇超声破乳并定容至刻度,于 745 nm 处测定吸光度 *A* 值(*A*₂);将 *A*₁、*A*₂ 代入“2.2.2”项下线性回

归方程计算 DiR-LP 中 DiR 含量(*C*₁)和总药量(*C*₂)。计算 DiR-LP 包封率(*C*₁/*C*₂)。

2.3 DiR-LP处方单因素考察

脂质体主要由卵磷脂与胆固醇组成,其中卵磷脂按照来源可分为蛋黄卵磷脂与大豆卵磷脂,蛋黄卵磷脂价格昂贵,制备的脂质体较混浊,可采用高纯度大豆卵磷脂。前期使用磷酸盐缓冲溶液、生理盐水制备脂质体时,脂质体溶液均在 12 h 后产生沉淀,选择纯净水为水化介质制备的脂质体溶液较为稳定。添加聚山梨酯 80,其疏水端插入双分子膜,亲水端聚氧乙烯基从脂质双层中伸出,覆盖于双层表面,形成有一定厚度的亲水层,增加了膜的有效厚度,防止脂质体间相互聚集融合和沉淀,可使脂质体结构稳定性提高^[11]。

2.3.1 胆脂比 固定其他因素不变,分别以胆固醇:大豆卵磷脂为 1:4、1:6、1:8、1:10、1:12,按“2.1”项方法制备 DiR-LP,测定其包封率为 87%、93%、94%、96%、94%。结果表明,胆脂比 1:10 包封率最高。

2.3.2 药脂比 固定胆脂比 1:10,其他因素不变,分别以 DiR:大豆卵磷脂为 1:240、1:320、1:400、1:480、1:560 制备 DiR-LP,测定其包封率为 91%、96%、96%、95%、96%。结果表明,DiR:大豆卵磷脂大于 1:320 后包封率基本不变,选择载药量较大的药脂比 1:320。

2.3.3 磷脂质量浓度 固定胆脂比 1:10、药脂比 1:320,固定其他因素不变,分别以磷脂质量浓度为 24、12、8、6、4.8 mg·mL⁻¹ 制备 DiR-LP,测定其包封率为 91%、96%、96%、97%、97%。结果表明,磷脂质量浓度小于 12 mg·mL⁻¹ 后包封率基本不变,选择载药量较大的磷脂质量浓度 12 mg·mL⁻¹。

2.3.4 聚山梨酯 80 比例 固定胆脂比 1:10、药脂比 1:320、质量浓度 12 mg·mL⁻¹,固定其他因素不变,分别以大豆卵磷脂:聚山梨酯 80 为 1:1、1:0.75、1:0.5、1:0.25、1:0.1 制备 DiR-LP,测定其包封率为 92%、94%、93%、93%、94%。结果表明,此范围内聚山梨酯 80 比例对包封率影响不大,且比例过大易造成溶血,选择大豆卵磷脂与聚山梨酯 80 比例 1:0.1。

2.4 DiR-LP制备工艺单因素考察

DiR 为疏水性物质,疏水性物质多采用薄膜分散法制备。水化条件是制备脂质体的关键环节,可能同时影响脂质体的包封率、粒径及分布,需结合测定数据综合选择制备工艺。

2.4.1 水化温度 固定处方不变,考察水化温度分

别为40、45、50℃制备DiR-LP对包封率及粒径的影响。结果表明,40℃制备的DiR-LP包封率最高,且粒径最小。结果见图1。

2.4.2 水化时间 固定处方不变、水化温度40℃,考察水化时间分别为30、60、90 min制备DiR-LP对包封率及粒径的影响。结果表明,随着水化时间的延长,脂质体粒径逐渐减小,但包封率呈先增高后

下降趋势,选择60 min水化时间能得到最高包封率与适宜粒径的DiR-LP。结果见图1。

2.4.3 超声时间 固定处方不变、水化温度40℃、水化时间60 min,考察超声时间分别为10、15、20 min制备DiR-LP对包封率及粒径的影响。结果表明,超声10 min制备的DiR-LP具有最高包封率与最小粒径。结果见图1。

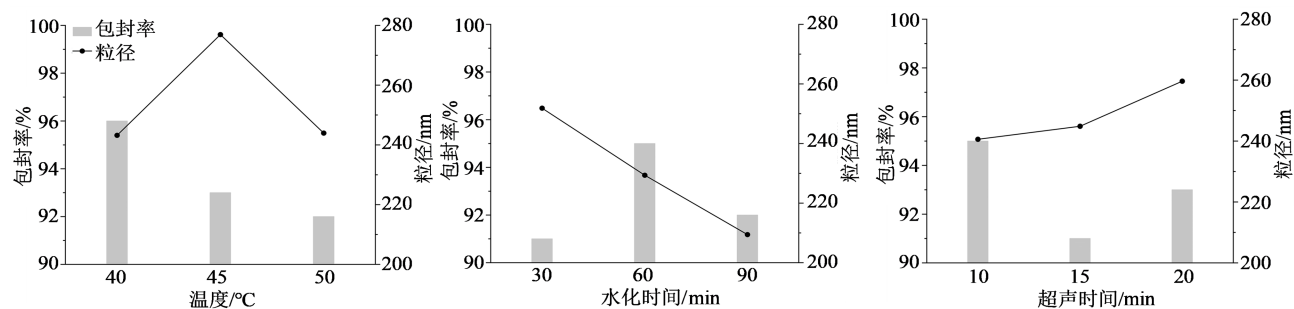


图1 制备工艺单因素考察结果

Fig. 1 Results of single factor investigation of preparation process

2.4.4 DiR-LP最佳处方与制备工艺 精密称取大豆卵磷脂120 mg、胆固醇12 mg、DiR 0.375 mg于100 mL茄形瓶中,加入10 mL无水乙醇溶解,于40℃恒温水浴中,30 r·min⁻¹旋转减压蒸发1 h,形成均匀透明薄膜;再加入聚山梨酯80 12 mg、溶于纯净水10 mL,于150 r·min⁻¹旋转常压水化1 h后,置于冰水浴中超声10 min(功率100 W),分别过0.45、0.22 μm微孔滤膜整粒3次,即得DiR-LP,于4℃冷藏保存。

2.5 DiR-LP的表征

2.5.1 外观与显微形态 观察刚制备的DiR-LP为均一蓝绿色乳状液体。用透射电镜(TEM)进行显微形态观察,图2可见DiR-LP多为圆形或椭圆形。

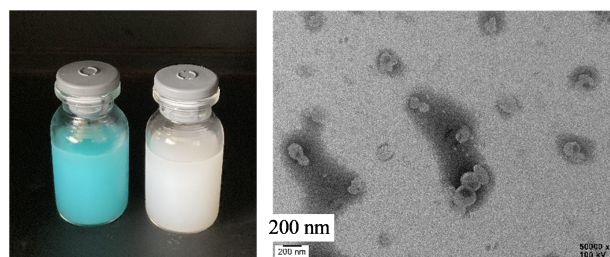


图2 脂质体外观(左)与显微形态(右)

Fig. 2 Appearance (left) and microscopic morphology (right) of liposomes

2.5.2 粒径与Zeta电位的测定 DiR-LP样品经10倍量纯净水稀释后,用纳米激光粒度仪测定其粒径与Zeta电位,结果见图3。

2.5.3 最佳工艺验证 照优化后的处方与工艺制备DiR-LP,验证优化后的处方与工艺,结果见表1。

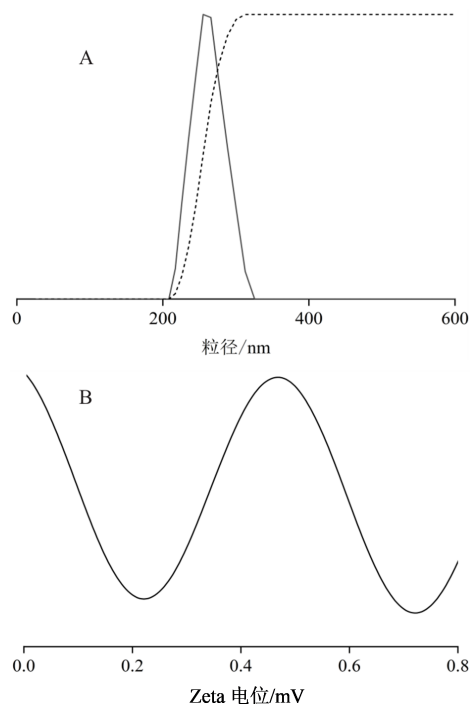


图3 粒径分布(A)及Zeta电位分布(B)

Fig. 3 Particle size distribution (A) and Zeta potential distribution (B)

结果显示,此法制备的DiR-LP稳定性较好、包封率高、粒径适宜,可用于后续实验使用。

2.6 柴胡联合DiR-LP给药方案

2.6.1 柴胡水提液的制备 按照李娇^[9]筛选的水提工艺提取。取柴胡粗粉,加10倍水加热回流提取3次,每次30 min,并调整药液生药质量浓度为0.05、0.10、0.20 g·mL⁻¹。

表1 优化后的处方与工艺验证结果

Table 1 Optimized formulation and process validation results

储存时间/d	包封率/%	粒径/nm	聚合物分散性指数	Zeta 电位/mV	外观性状	稳定性
1	95.2	254.10	0.196	-5.21	蓝绿色乳状液体	均一透明,无沉淀
7	95.2	252.88	0.243	-2.75	蓝绿色乳状液体	均一透明,无沉淀
14	94.6	255.59	0.270	-3.29	蓝绿色乳状液体	均一透明,无沉淀

2.6.2 实验动物分组及给药方案 30只小鼠(20~22 g)适应性喂养1周,随机分为5组:对照组、DiR-LP组和柴胡水提液低、中、高剂量(0.5、1.0、2.0 mg·kg⁻¹)+DiR-LP组,柴胡水提液+DiR-LP组预先连续3 d按10 mL·kg⁻¹体积ig相应的柴胡水提液,对照组和DiR-LP组小鼠ig相同体积的生理盐水。将ig 3 d后的小鼠进行尾脱毛处理,除对照组外,以10 mL·kg⁻¹尾iv DiR-LP,对照组小鼠尾iv相同剂量的生理盐水。

2.7 荧光图像与肝靶向性评价

将给药后不同时间点(4、5、6、8 h)的小鼠用异氟烷进行麻醉使其平躺,小动物活体成像仪荧光成像以750 nm作为激发光波长,785 nm作为发射光波长,以小鼠腹部为中心进行拍照,采集图像信息,示踪小鼠体内DiR-LP在不同器官的分布情况。

如图4所示,对照组小鼠体内未检测到荧光,其他组由于小鼠尾部荧光强度大,影响腹部荧光成像,故拍摄时用黑纸盖住。根据荧光信号部位初步判断,DiR-LP经尾iv后主要在肝脏中分布,符合脂质体体内分布特点,柴胡水提液+DiR-LP组肝脏部位荧光信号明显比DiR-LP组强,且柴胡水提液剂量越高信号越强。

8 h时经解剖取出心、肝、脾、肺、肾等器官,进行拍照,采集图像信息,示踪小鼠离体器官中DiR-LP的分布情况。如图5所示,随着柴胡水提液剂量升高,荧光信号更集中于肝脏部位,减少了在其他部位的分布。

3 讨论

目前治疗原发性肝癌(PHC)的首选治疗方法为手术切除,但80%的肝癌患者伴有明显的肝硬化,确诊时已无明确的手术指征^[12]。随着医学技术的发展,靶向药物及制剂技术成为新的癌症治疗研究突破口,与传统的化疗药相比,靶向药物优势在于能抵达病变部位,提高药物在病灶部位的聚集,有效地减少药物在其他组织的分布,从而减少不良反应,增加疗效^[13]。

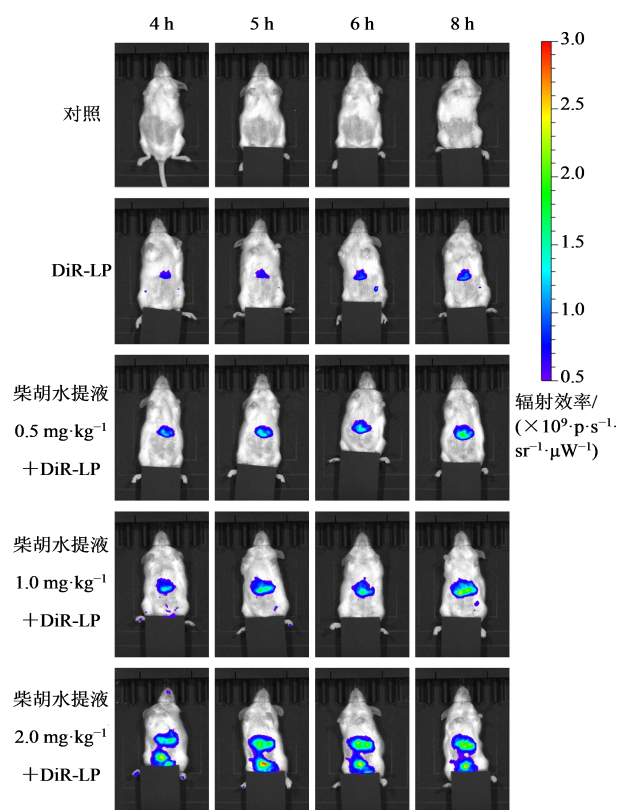


图4 DiR-LP荧光探针在小鼠体内的实时分布图

Fig. 4 Real-time distribution of DiR-LP fluorescent probe in mice

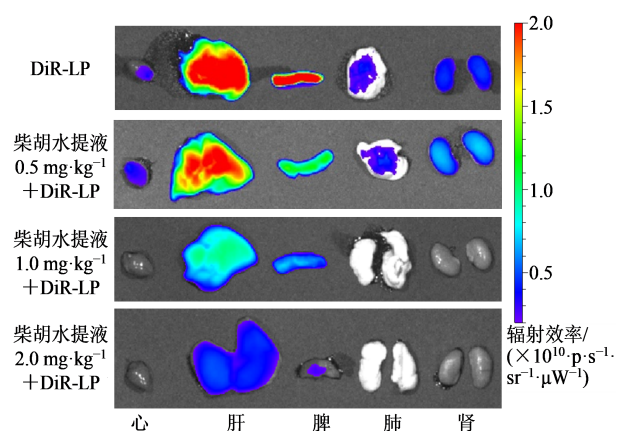


图5 DiR-LP荧光探针在小鼠离体器官分布图

Fig. 5 Distribution of DiR-LP fluorescent probe in isolated mouse organs

脂质体是近年发展迅速的靶向制剂,具有缓释性、低免疫原性、提高包封药物稳定性、降低包封药物毒性等优势^[14],除药物载体外,还用于荧光探针、基因转染等。引经是中医药理论的一大特色,在方剂配伍中通过运用引经药可改变其他药物的作用方向,使其作用侧重或集中于特定的部位,从而提高临床疗效^[15],与现代靶向治疗不谋而合,且中医药疗法不良反应小,各脏腑经络均有相应的引经药,如十二经引经药、病症引经药等,靶向部位广泛、系统,具有巨大开发前景。小动物活体成像是近年国际上医学研究中广泛的影像技术,其优势在于^[16]:①可在同一个体中重复多次获得一系列数据,避免个体差异;②可动态观察实验结果,并获得直观的图像与结果;③能够非侵入式地检测活体内的生物学特征,不必杀死动物,符合3R原则,最大限度地模拟人体内的生理病理状态。

本课题采用优化后制备的DiR-LP荧光探针,在活体小鼠体内初步验证柴胡“引经”性能,虽然中医藏象理论与现代医学的解剖学概念不完全吻合,但通过药动学等方法可侧面反映其内涵。其机制可能是柴胡有效成分——柴胡皂苷增强了小鼠肝脏细胞对DiR-LP的摄取,增加其在肝脏部位的滞留时间,影像学表现为肝脏部位荧光信号增强,使其可与肝脏组织或细胞充分作用,后续研究可将柴胡有效成分修饰于脂质体表面,同时作为肝靶向配体及药物载体使用。本研究将中药引经理论与现代靶向制剂有机结合,可为柴胡用于肝靶向制剂提供可行性实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] 葛文静,王慧森,刘明,等.引经药柴胡配伍大黄-丹参药对抗大鼠肝纤维化作用的研究[J].中国中医基础医学杂志,2018,24(10):1398-1401.
Ge W J, Wang H S, Liu M, et al. Effects of *Bupleurum* combined with *Rhubarb* and *Salvia miltiorrhiza* on hepatic fibrosis in rats [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2018, 24(10): 1398-1401.
- [3] 李娇,阮志国,李江,等.引经药柴胡对姜黄素在大鼠体内组织分布的影响[J].中国民族民间医药,2020,29(14):1-7.
Li J, Ruan Z G, Li J, et al. Effects of *Bupleurum chinense* as an medicinal guides on distribution of curcumin in rats [J]. Chin J Ethnophar, 2020, 29(14): 1-7.
- [4] Liu H, Wu D C. *In vivo* near-infrared fluorescence tumor imaging using DiR-loaded nanocarriers [J]. Curr Drug Deliv, 2016, 13(1): 40-48.
- [5] 程程欣,柯瑾,陈烁,等. DiR-PEG-PLGA 荧光纳米囊的制备、表征及体外生物相容性评价 [J]. 中国药房, 2018, 29(8): 1031-1035.
Cheng X, Ke J, Chen S, et al. Preparation, characterization and biocompatibility evaluation *in vitro* of DiR-PEG-PLGA fluorescent nanocapsules [J]. China Pharm, 2018, 29(8): 1031-1035.
- [6] 蒋沅岐,董玉洁,陈金鹏,等.中药靶向制剂的研究进展[J].中草药,2021,52(4):1156-1164.
Jiang Y Q, Dong Y J, Chen J P, et al. Research progress on targeted preparations of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(4): 1156-1164.
- [7] 戚建平,卢懿,董肖椿,等.纳米药物载体体内命运研究:环境响应型荧光染料的应用[J].药学报,2019,54(11):1965-1975.
Qi J P, Lu Y, Dong X C, et al. *In vivo* fate study of drug nanocarriers: The applications of environment-responsive fluorescent dyes [J]. Acta Pharm Sin, 2019, 54(11): 1965-1975.
- [8] 关延彬,韩冰,田雨冬,等.姜黄素脂质体的制备及质量评价[J].中药材,2019,42(2):385-389.
Guan Y B, Han B, Tian Y D, et al. Preparation and quality evaluation of curcumin liposomes [J]. J Chin Med Mater, 2019, 42(2): 385-389.
- [9] 李娇.引经药柴胡促姜黄素及纳米粒肝靶向作用研究[D].昆明:云南中医药大学,2020.
Li J. Boosting the liver-targeting effect of curcumin and DiR-PLGA-NPs via the meridian drug *Bupleurum* [D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [10] 梅佳华,普娟,高家菊,等.草果油纳米柔性脂质体的制备及体外透皮研究[J].中药材,2021,44(6):1451-1456.
Mei J H, Pu J, Gao J J, et al. Preparation of ultratflexible nanoliposomes of volatile oil from *Tsaoko fructus* and its transdermal study *in vitro* [J]. J Chin Med Mater, 2021, 44(6): 1451-1456.
- [11] 王祥.谷胱甘肽纳米脂质体的研制[D].无锡:江南大学,2008.
Wang X. The study on the preparation of glutathione nano-liposome [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.
- [12] 宗静静,卿鑫,樊哲,等.原发性肝癌治疗进展[J].东南大学学报(医学版),2021,40(4):542-547.
Zong J J, Qing X, Fan Z, et al. Progress in treatment of primary liver cancer [J]. J Southeast Univ Med Sci Ed,

- 2021, 40(4): 542-547.
- [13] 王 堃, 徐意祥, 韩潇, 等. 肝癌治疗靶点及相关药物研究进展 [J]. 中南药学, 2018, 16(6): 820-829.
- Wang K, Xu Y X, Han X, et al. Research progress in target and related drugs for hepatocellular carcinoma [J]. Central South Pharm, 2018, 16(6): 820-829.
- [14] 陈李霞, 丁越, 沈征武, 等. 胆固醇在脂质体中作用及甾醇、皂苷对其替换的研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(24): 6396-6404.
- Chen L X, Ding Y, Shen Z W, et al. Research progress on role of cholesterol in liposomes and replacement with sterols and saponins [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(24): 6396-6404.
- [15] 项丽玲, 苗明三, 李艳. 引经报使中药的现代认识与思考 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(10): 1269-1272.
- Xiang L L, Miao M S, Li Y. Contemporary understanding and reflection on the medicine be responsible for "meridian guiding" in treating diseases [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2019, 30(10): 1269-1272.
- [16] 杨丽华, 沈星凯, 符丹, 等. 小动物活体成像技术在肿瘤研究中的应用 [J]. 宁波大学学报: 理工版, 2013, 26(4): 115-118.
- Yang L H, Shen X K, Fu D, et al. *In vivo* imaging technology of small animals applied in cancer study [J]. J Ningbo Univ Nat Sci & Eng Ed, 2013, 26(4): 115-118.

【责任编辑 兰新新】