

• 药剂与工艺 •

槲皮素纳米混悬剂的制备、表征及抗乳腺癌研究

徐 浩^{1,2}, 高艺璇^{1,2}, 王向涛^{1,2*}

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘 要:目的 为解决槲皮素水溶性差的问题, 制备一种高载药量、适合静脉给药的纳米混悬剂, 并探究其体内外抗肿瘤作用。方法 采用反溶剂沉淀联合高压均质法, 以聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS) 为稳定剂制备了槲皮素纳米混悬剂 (quercetin nanosuspensions, Q-NSps)。动态光散射法测定粒径, 扫描电镜观察其形态, HPLC 法测定其载药量和体外药物释放情况, 并考察了其冻干保护、放置稳定性、溶血和静脉注射的适宜性; MTT 法检测槲皮素及其纳米混悬剂对 4T1、HeLa、HepG2 细胞的生长抑制作用; 以 4T1 荷瘤小鼠模型对比考察其体内抗肿瘤效果。结果 制备的 Q-NSps 大小均匀, 呈球型, 平均粒径 143.9 nm, PDI 为 0.231, 表面电位 -22.6 mV; 载药量 (45.82±1.73)%, 用 1% 麦芽糖为保护剂冻干复溶后粒径变化不大; Q-NSps 30 d 放置稳定, 不溶血, 可静脉注射; 体外有良好的缓释作用, 144 h 累积释放 82.86%; 对 4T1、HeLa、HepG2 的生长抑制均显著高于游离药物, 在体内研究中, 45 mg/kg 的 Q-NSps 与阳性药紫杉醇注射液 (8 mg/kg) 表现出相同的抑瘤效果 (56.78% vs 55.08%, $P>0.05$)。结论 制备的 Q-NSps 粒径小, 稳定性好, 显著提高了槲皮素体内外抗肿瘤效果, 有望成为一种抗肿瘤药物用于临床。

关键词: 槲皮素; 纳米混悬剂; 细胞毒性; 抗肿瘤; 乳腺癌

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)01-0042-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.009

Preparation, characterization, and anti-4T1-tumor efficacy of quercetin nanoparticles

XU Hao^{1,2}, GAO Yi-xuan^{1,2}, WANG Xiang-tao^{1,2}

1. Life Sciences and Environmental Sciences Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective In order to solve the problem of poor water solubility of quercetin, quercetin nanosuspensions (Q-NSps) with high drug loading and suitable for intravenous administration was prepared, and study its anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Quercetin was made into nanoparticles (Q-NSps) via the method of anti-solvent precipitation combined with high-pressure homogenization using polyethylene glycol 1 000 vitamin E succinate (TPGS) as stabilizer. The particle size of the resultant nanoparticles was measured by dynamic light scattering and the morphology was observed by scanning electron microscopy. The drug loading and the *in vitro* drug release were measured using HPLC analysis. In the meantime, the lyoprotectants were screened, the storage stability, hemolysis, and the suitability for intravenous injection were also studied; The *in vitro* anti-tumor activity of quercetin and its nanoparticles were assessed in contrast using MTT assay and the *in vivo* anti-tumor therapeutic efficacy was investigated using 4T1 tumor bearing mice. **Results** Q-NSps had uniform size and spherical shape, the average particle size was 143.9 nm, the polydispersity index (PDI) was 0.231, and the Zeta potential was -22.6 mV. The drug loading content was (45.82 ± 1.73) %. Using 1%

收稿日期: 2018-09-10

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金资助项目 (U1401223)

作者简介: 徐 浩 (1993—), 男, 黑龙江鹤岗人, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型。Tel: 13641253938 E-mail: 654009700@qq.com

*通信作者 王向涛 (1973—), 男, 河南洛阳人, 研究员, 博士, 主要从事药物新剂型研究。

Tel: 18101037961 Fax: (010)57833264 E-mail: xtaowang@163.com

maltose as lyoprotectant, Q-NSps could be lyophilized and then reconstituted into nanoparticles of the similar size. Q-NSps were stable for 30 d at storage, showed no hemolysis, and were suitable to intravenous administration. The resultant nanosuspensions displayed a good sustained *in vitro* release, and the cumulative release reaching 82.86% at 144 h. Q-NSps showed significantly higher growth inhibition against 4T1, HeLa, and HepG2 cell lines. The *in vivo* study demonstrated that Q-NSps (45 mg/kg, iv) had the similar antitumor therapeutic efficacy as paclitaxel injections (56.78% vs 55.08%, $P > 0.05$). **Conclusion** The obtained Q-NSps had small particle size, good stability, and significantly improved anti-tumor effect of quercetin *in vitro* and *in vivo*, so Q-NSps are promising to be a antitumor drug for application in clinic.

Key words: quercetin; nanosuspensions; cytotoxicity; antitumor; breast cancer

槲皮素是广泛分布于自然界的一种黄酮类化合物,大量存在于常见的植物和蔬菜水果中,如浆果、茶、苹果、洋葱等^[1]。研究表明,槲皮素具有多种生物活性,如抗微生物^[2]、抗病毒^[3]、抗炎^[4]、抗氧化、神经保护^[5]、抗冠心病^[6]、抗糖尿病^[7]、修复脑损伤^[8]、免疫调节和抗癌等^[9-12]。槲皮素不但自身具有抗肿瘤作用,还能改善肿瘤微环境,包括降低肿瘤细胞的多药耐药性和竞争性抑制相关代谢酶^[13]。由于安全性好,槲皮素的抗肿瘤作用近年来也受到很多关注。

但槲皮素水溶性极低(1.66~7.70 $\mu\text{g/mL}$),难以给药,同时口服生物利用度极低^[14-16],这些限制了槲皮素的进一步体内研究和疗效的发挥。为此,研究人员尝试通过制剂手段解决这一问题。邵伟等^[17]和宋全道等^[18]制备了槲皮素-羟丙基- β -环糊精包合物,在水中药物质量浓度最高达 34.23 mg/mL,遗憾的是只有简单的体外研究,能否适合口服给药和静脉注射无从知晓。李韶静等^[19]以聚维酮 K30、聚乙二醇 6000 和木糖醇为载体,用熔融-溶剂法制备槲皮素固体分散体,5 min 时溶出度是原料药的 156 倍,对大鼠的口服生物利用度对比原料药组提高了 61 倍,但固体分散体只能口服给药,无法静脉注射。庞鑫^[20]合成了透明质酸与槲皮素结合物,自组装成胶束(HA-QT),平均粒径 172.1 nm,载药量 10.2%。水中溶解度接近 1 mg/mL,半衰期(3.3 h)远高于槲皮素溶液(0.17 h),生物利用度提高 3.9 倍。

槲皮素作用强度不高,体内研究和临床应用通常需要较大剂量连续给药。尽管其他制剂也有研究,如槲皮素的聚合物纳米粒、脂质体和微乳等^[21-23],但和 HA-QT 一样,载药量都较低,无法满足槲皮素大剂量给药的需要。同时,槲皮素还存在广泛的体内代谢,尤其是肠道首关效应,导致大量槲皮素在肠道还未吸收就被大量代谢,据报道以槲皮素原形入血的比例常常不到 5%^[24]。

纳米混悬剂(NSps)是将难溶性药物在适量稳定剂的辅助下制备而成的纳米大小的药物颗粒,载药量可以高达 90%以上,使用含 PEG 链段的稳定剂还能起到长循环作用^[25-28]。本研究拟制备一种高载药、适合静脉注射的槲皮素纳米混悬剂(Q-NSps),避开肠道代谢的影响,直接静脉注射考察其抗肿瘤药效,对槲皮素抗肿瘤临床应用前景进行探讨。

1 材料与仪器

1.1 仪器和试剂

Zetasizer Nano ZS 90 型粒度仪/电位仪,英国 Malvern Instruments 公司;AL204 分析天平,美国 Mettler Toledo 公司;Master D 超纯水仪,上海和泰技术有限公司;Ultimate 3000 高效液相色谱仪,美国 Dionex 公司;Tecan Infinite M1000 PRO 全波长多功能酶标仪,瑞士 Tecan 公司;Venusil C₁₈ Plus 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);JSM-IT500 扫描电子显微镜,日本电子株式会社;KM-200DE 超声仪,昆山美美超声有限公司;PLPHR 2-4 LD Plus 低温冻干机,德国 Christ 有限公司;JN-3000 温控型高压均质机,广州聚能仪器有限公司;RYJ-12B 药物透皮释放仪,上海黄海有限公司;MCO-18AC 二氧化碳培养箱,日本 Sanyo 公司;IVIS Spectrum CT 小动物三维光学活体成像仪,美国 Caliper 公司;槲皮素,质量分数 98.0%,批号 117-39-5,北京英联有限公司;聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯(TPGS),批号 20121203,西安海斯夫生物有限公司;PEG-PCL2000,山东岱罡生物有限公司;卵磷脂(SPC),广州汉方有限公司;泊洛沙姆(P-188),美国 Sigma 公司;聚维酮(PVP),广东粤美化工有限公司;聚山梨酯 80(Tween-80, T80),国药化学试剂集团有限公司;聚乙烯吡咯烷酮(CMC),分析纯,相对分子质量 4 000,上海泰坦科技有限公司;甲醇、DMSO 均为实验室试剂。

1.2 动物及细胞

昆明小鼠,雌雄各半,体质量(20 $\pm$ 2) g,北

京维通利华实验动物技术有限公司, SPF 级, 合格证号 11400700215055, 许可证编号 SCXK(京)2016-0011。Balb/c 小鼠, 雌性, 体质量 (20 ± 2) g, 北京华阜康动物技术有限公司, SPF 级, 合格证号 11401300078017, 许可证编号 SCXK(京)2014-004; 鼠乳腺癌 4T1 细胞株、宫颈癌 HeLa 细胞株、肝癌 HepG2 细胞株, 北京协和医学院细胞中心; RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素双抗, 美国 Gibco 公司; 96 孔无菌培养板, 美国 Corning 公司。

2 方法与结果

2.1 Q-NSps 的制备及处方工艺优化

采用反溶剂沉淀法制备 Q-NSps。首先对稳定剂进行筛选, 依次精密称量 SPC、P188、PVP、T80、TPGS 和 PEG2000-PCL2000 各 5 mg, 分别与 5 mg 槲皮素共溶于 0.5 mL 甲醇中, 超声滴注到 5 mL 去离子水中 ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 W), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 减压旋转蒸发除去甲醇, Malvern 粒度仪/电位仪测量纳米混悬剂的粒径和电位, 平行 3 次。

其粒径和粒度分布情况如表 1 所示, 可见以 TPGS 为载体的纳米混悬剂粒径最小 (436.61 ± 29.73) nm, 同时其多分散指数 (PDI) 为 0.122 $\pm$ 0.032, 电位 (-17.8 ± 2.1) mV 也较好, 故以后就以 TPGS 为稳定剂制备 Q-NSps。

其次, 按照槲皮素与载体质量比 1:5、1:3、1:1、3:1、5:1 精密称取药物与上面筛选出来的稳定剂, 同上法制备 Q-NSps, 粒径及电位情况如表 2 所示, 可见 1:1 和 5:1 药载比制备的纳米混悬剂粒径较小, 其中以 1:1 的粒径最小, 故选择以药载比 1:1 制备纳米混悬剂。此时制得的纳米混悬剂平均粒径 (441.62 ± 24.80) nm, PDI 值为 0.135 $\pm$ 0.011, 电位是 (-18.1 ± 2.4) mV。

然后, 固定温度 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 在超声功率 100、150、

表 1 不同稳定剂下 Q-NSps 的粒径及 PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Particle size and PDI of Q-NSps prepared with different stabilizers ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

载体	粒径/nm	电位/mV	PDI
SPC	$1\ 028.22 \pm 37.25$	-12.3 ± 1.6	0.485 ± 0.031
P188	$3\ 430.56 \pm 54.28$	-8.9 ± 0.9	0.523 ± 0.127
PVP	720.36 ± 33.25	-12.3 ± 2.1	0.233 ± 0.021
T80	850.22 ± 61.84	-13.3 ± 3.4	0.187 ± 0.015
TPGS	436.61 ± 29.73	-17.8 ± 2.1	0.122 ± 0.032
PEG2000-PCL2000	$3\ 513.88 \pm 72.87$	-11.3 ± 3.7	0.257 ± 0.013

表 2 不同药载比的粒径及 PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Particle size and PDI of Q-NSps prepared using different drug-TPGS ratios ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

载体比例	粒径/nm	电位/mV	PDI
1:5	858.06 ± 15.93	-14.4 ± 2.6	0.289 ± 0.044
1:3	616.86 ± 13.42	-6.9 ± 1.7	0.237 ± 0.025
1:1	441.62 ± 24.80	-18.1 ± 2.4	0.135 ± 0.011
3:1	501.46 ± 16.26	-9.3 ± 2.8	0.179 ± 0.026
5:1	483.13 ± 13.24	-7.8 ± 2.1	0.209 ± 0.040

200、250 W 条件下同上法制备 Q-NSps, 不同超声功率下制备的 Q-NSps 的粒径情况如表 3 所示, 可见随着功率的增强, 纳米混悬剂的粒径减小, PDI 降低, 提示高功率超声有助于纳米混悬剂粒径的匀化。以后的制备中, 选择在 250 W 进行超声。

接着, 在温度 5、20、35、50 $^{\circ}\text{C}$, 制备 Q-NSps, 质量浓度 1 mg/mL, 不同温度下制备纳米混悬剂的粒径情况如表 4 所示, 随着温度升高, 制备的 Q-NSps 的粒径和 PDI 略有增大, 5 $^{\circ}\text{C}$ 与 20 $^{\circ}\text{C}$ 时制备的粒径相差不大, 但考虑到制备的便利性, 选取在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下进行制备。

在 2 000 bar (1 bar=0.1 MPa) 的压力下, 均质 0、5、10、15 次, 考察是否均质及均质次数的影响。高压均质可有效降低纳米混悬剂的粒径, 从表 5 可知, 高压均质 5 次即可使粒径降低为原来的一半; 均质 10 次, 粒径进一步减小到 150 nm, 继续均质到 15 次, 粒径不再有明显改变, 故选取均质 10 次

表 3 不同超声功率的粒径及 PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Impact of ultrasonic power on particle size and PDI of resultant Q-NSps ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声功率/W	粒径/nm	电位/mV	PDI
100	502.52 ± 35.83	-15.3 ± 2.1	0.233 ± 0.043
150	470.74 ± 42.76	-16.7 ± 1.9	0.207 ± 0.034
200	440.68 ± 33.24	-16.5 ± 2.2	0.154 ± 0.023
250	438.66 ± 27.56	-17.8 ± 1.6	0.102 ± 0.062

表 4 不同温度的粒径及 PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Impact of temperature on size of resultant Q-NSps ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制备温度/ $^{\circ}\text{C}$	粒径/nm	电位/mV	PDI
5	433.24 ± 30.38	-18.3 ± 1.6	0.131 ± 0.089
20	436.36 ± 29.73	-17.8 ± 1.8	0.122 ± 0.032
35	450.56 ± 47.28	-16.9 ± 2.2	0.158 ± 0.092
50	470.57 ± 50.28	-17.0 ± 2.1	0.205 ± 0.087

来制备 Q-NSps。

最后, 在 1 000、1 500、2 000 bar 的压力下均质, 结果如表 6 所示, 随着均质压力的上升纳米粒径明显减少, 故选用 2 000 bar 为均质 压力。

表 5 不同均质次数的粒径及 PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Particle size and PDI of Q-NSps before and after homogenization ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

均质次数	粒径/nm	电位/mV	PDI
0	436.68±59.73	-17.8±3.4	0.122±0.032
5	219.45±25.30	-19.6±2.3	0.351±0.019
10	143.96± 3.90	-22.6±1.6	0.242±0.007
15	141.77± 3.75	-22.4±1.5	0.231±0.023

表 6 不同均质压力的粒径及 PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Particle size and PDI of Q-NSps after different homogenization pressures ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

均质压力/bar	粒径/nm	电位/mV	PDI
1 000	236.68±48.36	-14.9±1.4	0.212±0.021
1 500	153.74± 5.87	-20.7±2.1	0.211±0.010
2 000	144.47± 3.05	-19.5±1.1	0.221±0.031

综上, 最优工艺为采用反溶剂沉淀联合高压均质法制备 Q-NSps。以 TPGS 为稳定剂, 和药物共溶于甲醇中, 在 20 ℃和 250 W 超声滴注到 8~10 倍体积的水中, 减压旋转蒸发除去甲醇, 2 000 bar (200 MPa) 高压均质 10 次。

采用最优工艺制备的 3 批 Q-NSps 的粒径为 (137.02±5.92)、(145.21±5.78)、(143.94±3.90) nm, PDI 依次为 0.342±0.042、0.231±0.023、0.293±0.012, 电位依次为 (-20.8±1.4)、(-22.6±1.5)、(-21.7±1.0) mV。第 3 批 Q-NSps 的粒径分布和实物照片见图 1, 成品呈淡黄色透明液体, 并且具有乳光。

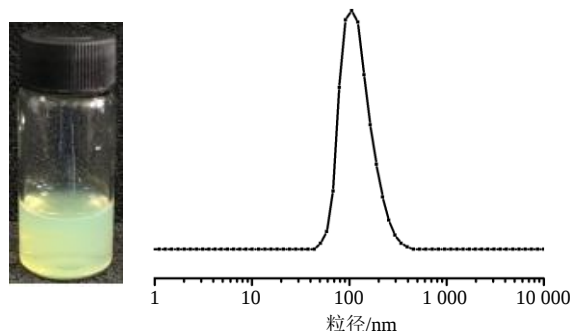


图 1 最优制备工艺下 Q-NSps 的实物图及粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution and image of Q-NSps prepared under optimal condition

2.2 Q-NSps 形态

取 1 mg/mL 的 Q-NSps 稀释 100 倍, 滴于铜柱后使用导电胶固定, 随后在真空、电流 30 mA 的条件下喷金 6 min, 加压至 30 mV, 使用扫描电镜观察形态, 如图 2 所示, Q-NSps 的粒径在 100~150 nm, 形态为圆球型, 大小均一。

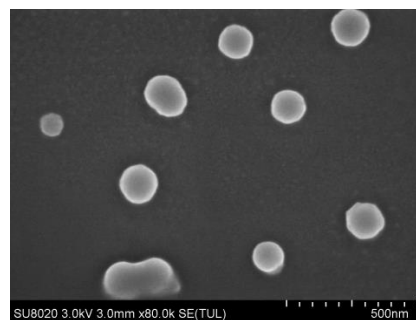


图 2 Q-NSps 扫描电镜图

Fig. 2 Scanning electron microscope image of Q-NSps

2.3 载药量的测定

参照文献方法^[29]建立槲皮素高效液相标准曲线, 精密称取槲皮素对照品 10 mg 于 100 mL 棕色量瓶中, 甲醇溶解, 定容至刻度, 摇匀, 得到 100 μg/mL 母液; 用色谱甲醇逐步稀释, 得到 100.0、75.0、50.0、20.0、10.0、5.0、1.0、0.1 μg/mL 系列质量浓度的对照品溶液; 分别取 20 μL 槲皮素对照品溶液进行高效液相分析, 色谱条件: 流动相为甲醇-0.4% 磷酸水溶液 (50:50), 检测波长 360 nm, 柱温 30 ℃, 体积流量 1 mL/min, 进样量为 20 μL, 以峰面积 (Y) 对槲皮素对照品溶液质量浓度 (X) 加权最小二乘法, 计算得出标准曲线为 $Y = 1.739 6 X + 0.187 5$, $R^2 = 0.999 8$ 。

精密取 5 mL 制备好的 Q-NSps, 不加任何保护剂直接冻干, 精密称量冻干粉质量, 即为总质量 (W_1); 然后加入 5 mL 甲醇使完全溶解, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清过 0.22 μm 水相滤膜, HPLC 测定滤液中槲皮素的药物质量浓度, 根据标准曲线计算冻干粉中槲皮素的质量 (W_2)。平行 3 份, 按照公式计算其载药量 (载药量 = W_2/W_1) 为 (45.82±1.73) %。实测载药量略小于 50% 的理论载药量, 可能是在高压均质过程中产生了损失。

2.4 稳定性考察

2.4.1 室温放置稳定性考察 Q-NSps 室温放置, 在 0、1、3、7、15、30 d 取样测其粒径, 结果粒径分别为 (143.72±3.51)、(144.63±3.62)、(147.13±3.71)、(152.21±3.76)、(178.65±3.83)、(203.36±

3.98) nm ($n=3$), 室温下放置 7 d 粒径没有明显变化, 15 d 后增大 20 nm 左右, 30 d 时继续增大 25 nm 左右, 同时无肉眼可见的聚集、浑浊和沉淀现象, 说明 Q-NSps 在室温下放置 1 周较稳定。

2.4.2 生理盐水、血浆中的粒径稳定性 取 Q-NSps (质量浓度 1 mg/mL) 与浓度为 1.8% 氯化钠溶液按照 1:1 等体积混合后, 或与小鼠血浆 1:4 混合, 37 °C 水浴孵育, 在 0、2、4、6、8 h 取样测其粒径, 结果生理盐水中的粒径分别为 (185.32 ± 2.61)、(189.66 ± 2.83)、(190.21 ± 3.48)、(193.75 ± 2.95)、(199.26 ± 3.01) nm ($n=3$), 血浆中的粒径分别为 (188.92 ± 3.41)、(189.42 ± 2.88)、(193.52 ± 3.01)、(195.91 ± 3.34)、(198.43 ± 2.95) nm ($n=3$)。在刚加入生理盐水与小鼠血浆时, 粒径都有 40 nm 左右的增大; 随孵育时间延长, 粒径略有增加; 孵育至 8 h, 平均粒径仍然在 200 nm 以下。说明从粒径稳定性角度, Q-NSps 可以以生理盐水为分散介质进行静脉注射。

2.5 红细胞溶血性考察

昆明小鼠眼球取血, 于 5 000 r/min 离心 5 min, 收集红细胞沉淀, 用生理盐水反复吹洗离心, 至离心后的上清液中没有红色, 再用生理盐水配制成 4% 压积的红细胞悬液。将槲皮素及 Q-NSps 用生理盐水调至等渗, 并配制成 0.25、0.50、1.00、2.50 mg/mL 的质量浓度, 1:1 等体积与 4% 的红细胞悬液混合, 37 °C 水浴孵育 4 h, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用酶标仪测量在 540 nm 的吸光度 (A) 值。取生理盐水与 4% 的红细胞悬液等体积混合作为阴性对照, 双蒸水与 4% 的红细胞悬液等体积混合作为阳性对照。0.25、0.5、1、2.5 mg/mL 质量浓度的 Q-NSps 与生理盐水等体积混合作为空白对照组。用以下公式计算溶血率 [溶血率 = (实验组 A 值 - 空白组 A 值 - 阴性对照组 A 值) / (阳性对照组 A 值 - 阴性对照组 A 值)]。溶血性实验结果表明, 即便在最高的药物实验质量浓度 2.5 mg/mL 下, Q-NSps 也未表现出任何溶血性, 结合之前在生理盐水和血浆中稳定性研究的结果, 说明本研究制备的 Q-NSps 适合静脉注射给药。

2.6 体外药物释放

精密称取 2 mL Q-NSps 装入透析袋 (截留相对分子质量 8 000~10 000) 内, 以 50 mL 含 1% SDS 的 PBS (pH 7.4) 为释放外液, 在 37 °C 搅拌下透析 (150 r/min), 每个样品平行 3 份。在 0.25、0.5、

1、2、4、8、12 h 取样 1 mL 并补入 1 mL 释放外液, 在 24、48、72、96、120、144 h 取样 1 mL 并更换释放外液。将释放外液 13 000 r/min 离心 10 min, HPLC 测定药物质量浓度, 计算累积释放率并绘制释放曲线, 结果如图 3 所示, Q-NSps 先是在 12 h 内有一个较快速的药物释放 (累积释放率达到 45.3%), 然后是 12~72 h 内释放稍慢, 累积释放达到 81%; 而后进入平台期, 释放缓慢, 至 144 h 累积释放 82.86%。对 Q-NSps 的释放动力学进行拟合可知, Q-NSps 的释放符合一级动力学释放方程 $Q=78.81(1-e^{-0.072t})$, $R^2=0.962$ 。

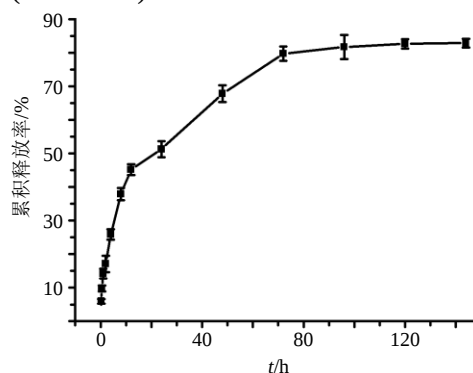


图 3 在含 1% SDS 的 PBS, 37 °C 下 Q-NSps 的累积释放率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Cumulative quercetin release from Q-NSps in PBS containing 1% SDS at 37 °C ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.7 冻干保护剂的筛选

纳米混悬剂分散在水中长期放置过程中, 易出现粒径增大、聚集甚至沉淀等不稳定现象, 为提高其稳定性, 常需要冻干成固态保存, 使用前加合适的分散介质重新分散。要使得纳米混悬剂冻干后加入水性分散介质能重新回到原来的状态并具有相似的粒径, 需加入冻干保护剂使纳米混悬剂保持原来的结构。药物不同, 所需的冻干保护剂的种类不同。精密吸取 7 份 Q-NSps (每份 2 mL, 质量浓度 1 mg/mL) 于西林瓶中, 分别加入乳糖、海藻糖、甘露醇、PVP、麦芽糖、蔗糖和 BSA 各 10 mg 为冻干保护剂 (5%), -80 °C 冰箱中预冻, 待样品冻实后冻干, 得到样品冻干粉。用 2 mL 纯水振摇复溶, 测定粒径, 结果如表 7 所示, 麦芽糖冻干效果最好, 冻干再分散后平均粒径 (239.64 ± 1.16) nm, 表面电位 (-20.6 ± 1.4) mV。

继续取 8 份 Q-NSps (每份 2 mL, 质量浓度 1 mg/mL), 分别放入 0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的麦芽糖, 方法同上, 测定粒径,

结果如表 8 所示,发现在 0.1%~2.5%,加入 1%的麦芽糖冻干再分散后粒径最优 (175.20 ± 4.32) nm、良好的粒径分布 (PDI 0.198 ± 0.012) 和较高的表面电位 (-20.2 ± 1.7) mV。

表 7 不同冻干保护剂复溶后 Q-NSps 的粒径 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 7 Particle size of Q-NSps reconstituted after lyophilization using different lyoprotectants ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

冻干保护剂	比例/%	粒径/nm	PDI	电位/mV
乳糖	0.5		沉淀	
PVP	0.5	470.45 ± 7.98	0.748 ± 0.138	-7.6 ± 1.7
甘露醇	0.5	440.63 ± 16.38	0.382 ± 0.036	-17.6 ± 2.2
蔗糖	0.5	383.66 ± 32.26	0.460 ± 0.112	-18.4 ± 2.3
BSA	0.5	301.22 ± 5.82	0.254 ± 0.054	-18.6 ± 1.9
海藻糖	0.5	298.46 ± 3.40	0.326 ± 0.018	-17.6 ± 2.0
麦芽糖	0.5	239.64 ± 1.16	0.314 ± 1.150	-20.6 ± 1.4

表 8 不同比例下麦芽糖复溶后 Q-NSps 的粒径 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 8 Particle size of Q-NSps reconstituted after lyophilization using different maltose ratios ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

麦芽糖比例/%	粒径/nm	PDI	电位/mV
0.1	306.27 ± 3.42	0.218 ± 0.046	-19.8 ± 1.6
0.3	288.31 ± 4.64	0.216 ± 0.036	-20.6 ± 2.1
0.5	230.53 ± 6.52	0.180 ± 0.056	-17.8 ± 2.2
0.7	220.28 ± 6.24	0.182 ± 0.036	-19.2 ± 1.3
1.0	175.20 ± 4.32	0.198 ± 0.012	-20.2 ± 1.7
1.5	214.21 ± 3.62	0.214 ± 0.024	-18.4 ± 1.5
2.0	210.89 ± 2.34	0.206 ± 0.022	-14.2 ± 1.7
2.5	207.47 ± 0.28	0.188 ± 0.012	-17.2 ± 2.3

2.8 体外抗肿瘤作用研究

考察 Q-NSps 对 4T1、HeLa、HepG2 细胞的抑制率,将 Q-NSps 用不完全培养基稀释成 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 备用,槲皮素原料药用 50 μL 二甲基亚砜溶解并用不完全培养基配制成同样质量浓度备用。

在细胞培养箱 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2) 中培养 4T1、HeLa 和 HepG2 细胞。4T1 细胞用 10%胎牛血清、100 U/mL 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基培养。HeLa、HepG2 细胞用 10%胎牛血清、100 U/mL 青-链霉素的 DMEM 培养基培养,待细胞生长至对数期,用培养基稀释成细胞悬液,加入 96 孔板中 (每孔 1×10^4 个),继续培养细胞。24 h 后弃去培养液,依次加入不完全培养基 (对照组)、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 Q-NSps 及游

离槲皮素原料药,每个质量浓度 6 个复孔,四周 PBS 封闭,培养 72 h。随后每孔加入 MTT 溶液 20 μL ,孵育 4 h,吸弃每孔内液,加入 DMSO 200 μL ,震荡 10 min,在 570 nm 波长下测定 A 值。

槲皮素及其纳米混悬剂对 4T1、HeLa 和 HepG2 3 种细胞的抑制情况见图 4,可见槲皮素和 Q-NSps

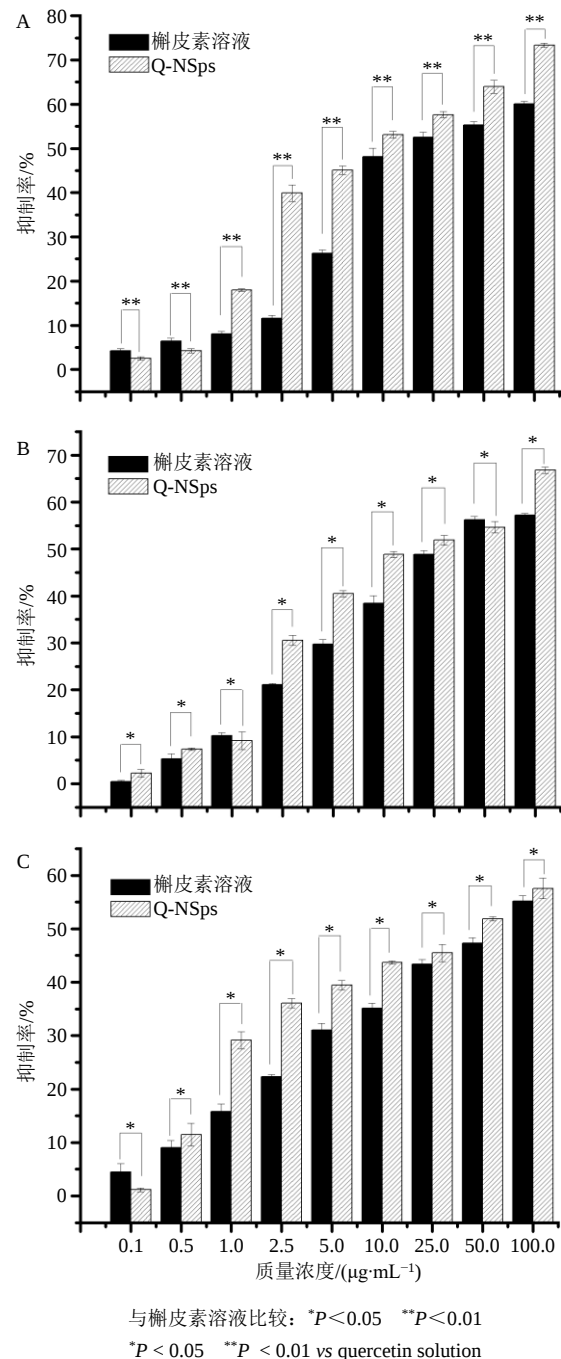


图 4 72 h 后 Q-NSps 对肿瘤细胞 4T1 (A)、HeLa (B) 和 HepG2 (C) 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Proliferation inhibition of Q-NSps against tumor cells 4T1 (A), HeLa (B), HepG2 (C) after 72 h of incubation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

均可抑制 3 种肿瘤细胞的生长, 呈现良好的剂量依赖关系; 除最低质量浓度 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 之外, 在其他所有质量浓度, 纳米混悬剂对 3 种肿瘤细胞的生长抑制作用显著或非常显著强于游离药物。计算所得的半数抑制浓度 (IC_{50}) 数据见表 9, 其中鼠乳腺癌 4T1 细胞对 Q-NSps 最敏感, IC_{50} 为 11.42 $\mu\text{g/mL}$, 随后的体内药效实验使用 4T1 荷瘤鼠进行研究。

表 9 槲皮素和 Q-NSps 对 4T1、HeLa 和 HepG2 的 IC_{50} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 IC_{50} values of Q-NSps and quercetin solution against 4T1, HeLa, and HepG2 cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		
	4T1	HeLa	HepG2
槲皮素溶液	29.08 ± 2.57	33.86 ± 2.35	53.01 ± 3.15
Q-NSps	$11.42 \pm 1.53^{**}$	$20.38 \pm 1.42^{*}$	$29.99 \pm 2.07^{*}$

与槲皮素溶液比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs quercetin solution

表 10 4T1 荷瘤小鼠的肝脾指数及各给药组体内抑瘤率 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 10 Liver and spleen indexes of various group of 4T1 tumor-bearing mice and *in vivo* antitumor inhibition rate of Q-NSps, PTX Injection and quercetin-CMC in 4T1 tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

处方	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	给药方式	肝指数	脾指数	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
阴性对照	—	iv	0.046 ± 0.046	0.032 ± 0.004	3.54 ± 0.35	—
阳性对照	8	iv	0.046 ± 0.056	0.030 ± 0.004	$1.59 \pm 0.22^{***\nabla\nabla\nabla}$	55.08
槲皮素原料药	70	ig	0.048 ± 0.004	0.028 ± 0.005	$2.88 \pm 0.19^{####}$	18.64
Q-NSps (iv)	20	iv	0.046 ± 0.002	0.028 ± 0.003	$2.55 \pm 0.16^{####\nabla}$	27.97
	45	iv	0.046 ± 0.004	0.030 ± 0.002	$1.53 \pm 0.21^{***\nabla\nabla\nabla}$	56.78
	70	iv	0.044 ± 0.003	0.028 ± 0.004	$1.98 \pm 0.10^{####\nabla\nabla\nabla}$	44.07
Q-NSps (ig)	70	ig	0.047 ± 0.002	0.029 ± 0.003	$2.48 \pm 0.22^{####\nabla}$	29.94

与阴性对照组比较: $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$; 与阳性对照组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{###}P < 0.001$; 与槲皮素原料药组比较: $\nabla P < 0.05$ $\nabla\nabla\nabla P < 0.001$

$^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs normal saline group; $^{*}P < 0.05$ $^{###}P < 0.001$ vs PTX Injections $\nabla P < 0.05$ $\nabla\nabla\nabla P < 0.001$ vs quercetin-CMC group

在 4T1 荷瘤鼠模型的体内抗肿瘤药效研究中, 各组小鼠瘤体积随时间增长情况见图 5-A, 肿瘤体积生长从快到慢依次为槲皮素原料药组、Q-NSps 低剂量组 (iv)、Q-NSps 高剂量 ig 组 (ig)、Q-NSps 高剂量组 (iv)、紫杉醇注射液组 (iv)、Q-NSps 中剂量组 (iv), 且与生理盐水阴性对照组相比, 差异均极显著 ($P < 0.001$)。

原料药在 70 mg/kg 剂量下 ig 给药, 抑瘤率只有 18.64%, 而 Q-NSps 在 20 mg/kg 剂量下 iv 给药, 抑瘤率可以达到 27.97%, 说明槲皮素 ig 给药生物利用度较低, 这与文献报道的结果一致^[30]。Q-NSps 高、中、低 3 个剂量 iv 给药, 中剂量 45 mg/kg 抑瘤率最高, 达到 56.78%, 和紫杉醇注射液的 55.08%

2.9 体内抗乳腺癌药效研究

按照“2.8”项方法培养 4T1 细胞, 用培养基配制 1×10^7 个/mL 的细胞悬液, 皮下接种在 Balb/c 小鼠右侧腋下 (每只 0.2 mL), 待瘤体积达到 100 mm^3 左右时, 随机分成 7 组 (每组 8 只), 分别为阴性对照组 (静脉注射生理盐水), 阳性对照组 (紫杉醇注射液, 8 mg/kg , iv), Q-NSps 高、中、低剂量组 (70、45、20 mg/kg , iv), Q-NSps 高剂量 ig 组 (70 mg/kg , ig), 槲皮素原料药组 (将槲皮素分散在 5% 的羧甲基纤维素钠溶液中, 搅拌或超声使其均匀分散, 70 mg/kg , ig)。静脉组每 2 天给药 1 次, ig 组每天给药, 每 2 天监测体质量和肿瘤体积。给药 7 次后将小鼠处死, 将肿瘤完全剥离并称重质量。按照下列公式计算体内肿瘤抑制率 (抑瘤率 = $1 - \text{实验组瘤质量} / \text{阴性组瘤质量}$), 结果见表 10。同时剖取肝和脾, 计算肝、脾指数 (肝、脾指数 = 肝、脾质量 / 小鼠体质量), 结果见表 10。

相近, 提示这个剂量给药的 Q-NSps, 从抗肿瘤药效强度上看具备了成药性。

高剂量 (45 mg/kg) 的 Q-NSps, 抑瘤率却只有 44.07%, 这可能是高剂量的槲皮素会扰乱含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶及凋亡调节蛋白 Bcl 和 Bax 的代谢^[31], 具体原因仍需要进一步探究。

将少量脂溶性的红外荧光探针 DiR 掺入到槲皮素药物中 (DiR-槲皮素 1 : 40, 质量比), 同法制备纳米混悬剂, 得到 DiR 标记的 Q-NSps。最后一次给药时, 中剂量组给予 DiR 标记的 Q-NSps, 24 h 后处死小鼠, 剖取肿瘤、心、肝、脾、肺和肾, 用小动物三维活体成像仪拍照 ($\lambda_{\text{激发波长}} = 748 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{发射波长}} = 780 \text{ nm}$; 分档因素: 8; 曝光时间: 4 s; 视

野: 14 cm)。经 DiR 荧光探针标记后, iv 到荷瘤鼠体内, 24 h 后各主要脏器的荧光照片见图 5-C, 强度分布见图 5-D, 可知 iv 后 Q-NSps 主要分布在肝和肿瘤, 其次为肾和脾。

药效研究过程中, 各组小鼠的相对体质量随时间变化情况见图 5-B (小鼠相对体质量=相应次数给药各组小鼠平均体质量/各组小鼠第 1 次给药时

平均体质量)。可见除原料药高剂量 ig 给药组体质量略有下降外, 其他各组小鼠体质量均未见下降, 且与生理盐水阴性对照组相比, 差异无统计学意义。各给药组的肝、脾指数和生理盐水阴性对照组接近, 差异无显著性, 提示虽然 Q-NSps 在肝、脾中有较多分布, 但并未对肝脾造成明显损伤, 也从侧面证明槲皮素具有较好的生物安全性。

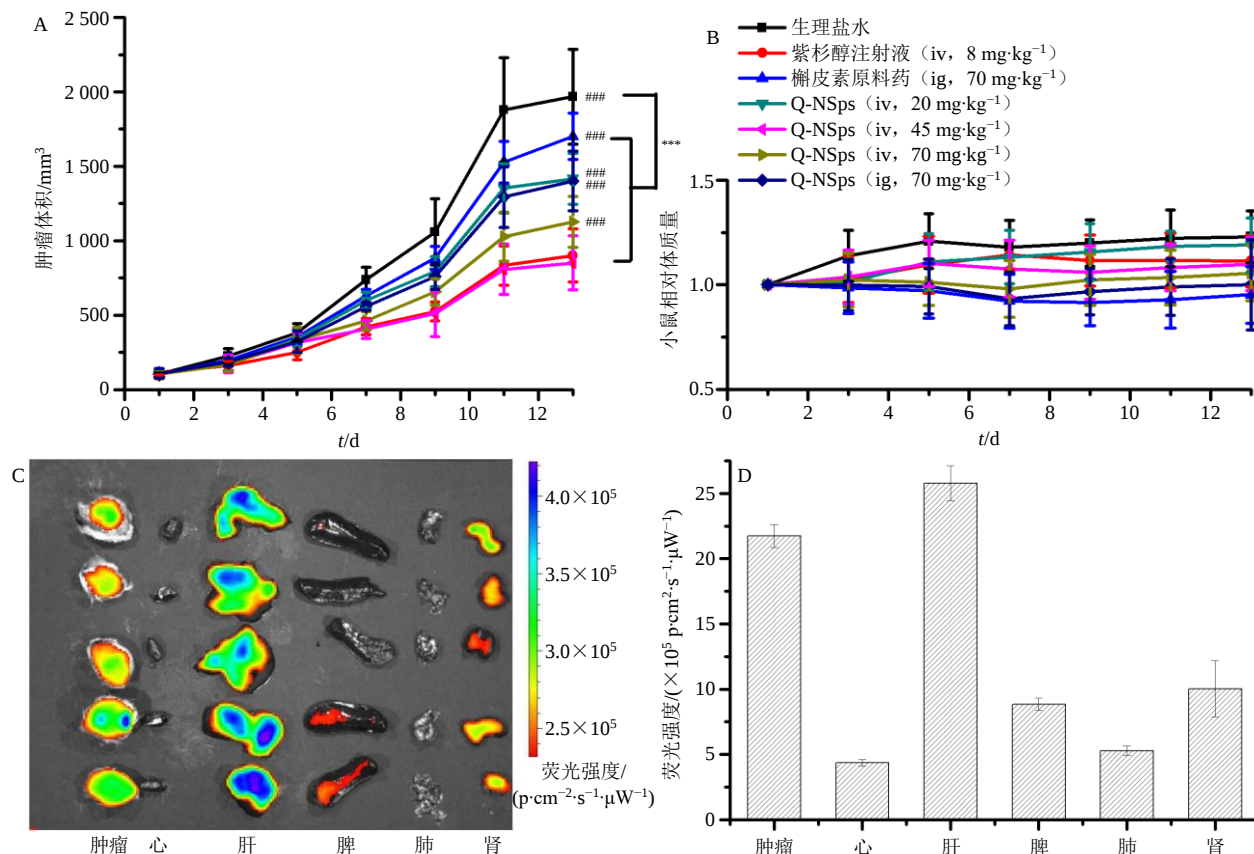


图 5 槲皮素及 Q-NSps 对 4T1 荷瘤小鼠体内抗肿瘤效果
Fig. 5 *In vivo* antitumor efficacy of quercetin and Q-NSps in 4T1 tumor bearing mice

2.10 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件的单因素方差分析来考察各实验组数据, 所得实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 讨论

槲皮素分布广泛并对多种肿瘤细胞具有抑制效果, 但其水溶性低, 并存在广泛的肠道代谢, 导致其口服生物利用度很低, 这些限制了其药效发挥和在临床上的应用。本研究选用 TPGS 为载体, 在

20 °C 和 250 W 超声滴注, 2 000 bar 高压均质 10 次, 制备得到 Q-NSps, 其外观呈球形, 平均粒径 (143.90 ± 3.90) nm, 表面电位 (−22.6 ± 1.5) mV。TPGS 不仅可以作为表面活性剂, 还可以抑制肿瘤细胞膜表面 P-糖蛋白的高表达, 用于克服肿瘤的多药耐药性^[32]。故以 TPGS 为稳定剂制备 Q-NSps, 有助于实现对肿瘤更好的治疗效果。本实验制备的 Q-NSps 室温放置较稳定, 并可通过加入 1% 的麦芽糖冻干, 冻干后的粉末可长时间保存, 临用前加水

振摇即可分散到粒径在 200 nm 以下, iv 给药后对乳腺癌荷瘤鼠的抑瘤率和阳性药紫杉醇注射液相当, 具有较好的应用前景。

在稳定剂的初筛过程中, 以 SPC 和 PVP 为稳定剂的 Q-NSps, 粒径仅比以 TPGS 为稳定剂的稍大, 如对方工艺进行进一步优化, 也有可能成为 Q-NSps 的有效稳定剂。不同稳定剂制备的纳米混悬剂, 其粒径大小、表面性质、药物释放行为会有所不同, 从而为槲皮素的纳米给药系统带来更多的选择。

在 MTT 实验中, Q-NSps 较游离槲皮素的 IC_{50} 值显著降低, 原因可能是纳米粒能通过非特异性吸附与细胞相互作用, 增加了被细胞摄取的机会^[33]。在体内药效学研究中, 同样的剂量 (70 mg/kg) ig 给药, Q-NSps 的抑瘤率 (29.94%) 显著高于原料药的 1% CMC 混悬液 (18.64%, $P < 0.05$), 说明纳米混悬剂的生物利用度要显著高于原料药, 这可能与纳米混悬剂提高了药物的溶出和释放有关。而 Q-NSps iv 在 45 mg/kg 的剂量下, 抑瘤率高达 56.78%, 远高于 70 mg/kg 的 ig 给药组的 29.94%, 说明即便是纳米混悬剂, 口服给药的生物利用度也很有限, 其原因主要是槲皮素存在强烈的肠代谢, 释放出来的药物很大比例在吸收之前就被肠道的酶系统代谢。所以, 将槲皮素制备成纳米混悬剂 iv 给药, 避开肠道代谢, 提高生物利用度, 是临床应用可行的制剂形式。

对于纳米混悬剂的组织分布考察, 本实验是在药效研究接近终点时, 将近红外探针标记到 Q-NSps 中给药, 然后剖取主要的脏器, 通过小动物活体成像仪直接检测各脏器的荧光强度, 来了解其在各组织中的分布情况。这样做的好处是, 组织分布和药效研究在同一批荷瘤鼠上进行, 获得的组织分布数据和抗肿瘤药效直接相关, 同时能更好地反映多次给药治疗后 Q-NSps 在荷瘤鼠中的组织分布情况。

综上, 研究制备的 Q-NSps 粒径小, 稳定性好, 显著提高了槲皮素体内外抗肿瘤效果, 有望成为一种治疗性药物用于临床。

参考文献

- [1] McClements D J, Xiao H. Designing food structure and composition to enhance nutraceutical bioactivity to support cancer inhibition [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 46(3): 215-226.
- [2] Andres S, Tejido M L, Bodas R, et al. Quercetin dietary

supplementation of fattening lambs at 0.2% rate reduces discolouration and microbial growth in meat during refrigerated storage [J]. *Meat Sci*, 2013, 93(2): 207-212.

- [3] Johari J, Kianmehr A, Mustafa M R, et al. Antiviral activity of baicalein and quercetin against the Japanese encephalitis virus [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12): 16785-16795.
- [4] Boots A W, Wilms L C, Swennen E L, et al. In vitro and ex vivo anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers [J]. *Nutrition*, 2008, 24(7/8): 703-710.
- [5] Du G, Zhao Z, Chen Y, et al. Quercetin protects rat cortical neurons against traumatic brain injury [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6): 7859-7865.
- [6] 王秋红, 匡海学, 吴伦, 等. 二氢槲皮素对异丙肾上腺素致大鼠心肌缺血的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(17): 177-180.
- [7] Yang D K, Kang H S. Anti-diabetic effect of cotreatment with quercetin and resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Biomol Ther Seoul*, 2018, 26(2): 130-138.
- [8] Yang Q L, Chen Y F. The effect of quercetin on the long-term memory and PARP-1/AIF signal path in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage [J]. *J Clin Pediatr*, 2016, 12(34): 936-941.
- [9] 杨扬, 郭举. 具有抗肿瘤活性的槲皮素衍生物研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(6): 1468-1475.
- [10] 付丽娜, 刘维红, 徐爱军, 等. 槲皮素对人胃癌 MKN45 细胞的抑制作用研究 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(6): 983-986.
- [11] 牟丽秋, 杜俊, 胡旖耘, 等. 杜仲中槲皮素、京尼平苷及桃叶珊瑚苷对小鼠成骨样细胞系 MC3T3-E1 增殖和分化的影响 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(2): 165-169.
- [12] Chan S T, Chuang C H, Lin Y C, et al. Quercetin enhances the antitumor effect of trichostatin A and suppresses muscle wasting in tumor-bearing mice [J]. *Food Funct*, 2018, 9(2): 871-879.
- [13] Li S, Yuan S, Zhao Q, et al. Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 100(2): 441-447.
- [14] 陈丽娜, 任晓亮, 刘亚男, 等. 槲皮素平衡溶解度的测定及热力学计算 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(6): 1006-1009.
- [15] van Zanden J J, Wortelboer H M, Bijlsma S, et al. Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(4): 699-708.

- [16] Li H, Zhao X, Ma Y, *et al.* Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2009, 133(3): 238-244.
- [17] 邵伟, 谢清春, 王春香, 等. 槲皮素-羟丙基- β -环糊精包合物的研究 [J]. 中药材, 2002, 25(2): 121-123.
- [18] 宋全道, 丁易, 李新民, 等. 羧甲基- β -环糊精的溶血作用及对槲皮素的增溶作用 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2005, 43(2): 166-169.
- [19] 李韶静, 廖应芬, 杨慧慧, 等. 槲皮素固体分散体的制备及大鼠体内生物利用度研究 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4229-4234.
- [20] 庞鑫. 透明质酸——槲皮素结合物自组装胶束的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [21] 吴金花, 段金虹, 许海燕, 等. 载有槲皮素的 PEG-PE 胶束对乳腺癌细胞耐药性的逆转效应 [J]. 基础医学与临床, 2015, 35(2): 174-177.
- [22] 袁志平, 陈俐娟, 魏于全, 等. 纳米脂质体槲皮素对肝癌腹水抑制效应实验研究 [J]. 癌症, 2006, 24(8): 941-945.
- [23] 宋道, 段玺, 赵鹏, 等. 槲皮素亚微乳在鼠体内药代动力学及组织分布研究 [J]. 中药材, 2016, 39(1): 160-163.
- [24] 伍贤学. 生物活性黄酮槲皮素的前药设计与合成研究 [D]. 成都: 四川大学, 2005.
- [25] Hong J, Li Y, Xiao Y, *et al.* Annonaceous acetogenins (ACGs) nanosuspensions based on a self-assembly stabilizer and the significantly improved anti-tumor efficacy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 145: 319-327.
- [26] 苏文晶, 肖瑶, 张明珠, 等. 番茄素纳米混悬剂的制备及其抗肿瘤作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(6): 966-972.
- [27] 申宝德, 连王权, 沈成英, 等. 微型化介质研磨法制备难溶性黄酮类化合物纳米混悬剂 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4413-4418.
- [28] 王义, 王文倩, 尹萌, 等. 1,3-二羟基异丙氧基-琥珀酸-8-莪术醇酯纳米混悬剂的制备及其性能研究 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(4): 579-583.
- [29] 童学飞, 吴雪, 杨智海. 高效液相色谱法同时测定滋肝益气丸中槲皮素和丹皮酚含量 [J]. 中国药业, 2016, 25(16): 67-69.
- [30] 阮婧华, 杨付梅, 张金洁, 等. 槲皮素纳米结构脂质载体增加口服吸收机制研究 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(5): 368-373.
- [31] 杜宁. 高槲皮素黄酮银杏叶注射液对荷瘤鼠抑瘤作用研究 [D]. 保定: 河北大学, 2015.
- [32] Lee E S, Na K, Bae Y H. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor [J]. *J Control Release*, 2005, 103(2): 405-418.
- [33] 郑亚静, 陈红丽, 唐红波, 等. 普鲁兰基肿瘤靶向纳米粒的体外抑瘤效应和细胞摄取途径研究 [J]. 医学研究生学报, 2015, 28(2): 127-130.