

舒林酸纳米混悬剂的制备及其体内外抗肿瘤作用研究

王一安, 付婧欣, 李好文, 敖慧, 郭一飞, 韩美华, 王向涛*

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 制备舒林酸纳米混悬剂, 并考察其对肿瘤组织的抗肿瘤作用。方法 以油酸钠为稳定剂, 通过反溶剂沉淀法制备舒林酸纳米混悬剂, 考察其粒径大小、分散指数、电位及颗粒形状, 采用 MTT 比色法使用乳腺癌细胞 MCF-7、4T1 进行体外抗肿瘤药效评价, 采用 4T1 荷瘤小鼠进行体内抗肿瘤评价。结果 舒林酸纳米粒形状为球形, 分散指数值小于 0.3, 平均粒径为 (264.1±2.9) nm。相比较于游离药物, 纳米粒显著提高了舒林酸对乳腺癌细胞的抑制作用, 对 MCF-7、4T1 的 IC₅₀ 值分别为 (22.1±4.6)、(19.2±1.2) μg/mL, 体内抑瘤率为 (35.4±18.8)%。结论 将舒林酸制备成纳米粒后, 拓宽了舒林酸的给药途径, 显著增强其抗肿瘤作用。

关键词: 舒林酸纳米混悬剂; MCF-7 细胞; 4T1 细胞; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)01-0016-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.01.004

Preparation of sulindac nanosuspension and its anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo*

WANG Yi-an, FU Jing-xin, LI Hao-wen, AO Hui, GUO Yi-fei, HAN Mei-hua, WANG Xiang-tao

The Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To prepare sulindac nanosuspensions, and study its anti-tumor effect. **Methods** Sulindac nanosuspensions were prepared with sodium oleate as stabilizer. The quality of nanosuspension was evaluated by particle size, dispersion index (PDI), potential and electron micrograph morphology. MTT colorimetric assay and MCF-7 cells and 4T1 were used for *in vitro* antitumor effect, and 4T1 tumor-bearing mice were used for anti-tumor effect *in vivo*. **Results** The shape of sulindac nanosuspensions was spherical, the PDI value was less than 0.3, and the particle size was (264.1 ± 2.9) nm. The anti-tumor effect was significantly improved compared with the drug substance *in vitro* and the IC₅₀ values for MCF-7 and 4T1 were (22.1 ± 4.6) and (19.2 ± 1.2) μg/mL. Tumor inhibition rate *in vivo* was (35.4±18.8)%. **Conclusion** The preparation of sulindac into nanoparticles by nano preparation technology broadened the drug delivery pathway of sulindac and significantly enhanced the anti-tumor effect.

Key words: sulindac nanosuspensions; MCF-7 cells; 4T1 cells; anti-tumor

炎症正在成为癌症的特征之一^[1-2]。许多癌症都与炎症相关, 如结肠炎、病毒性肝炎、非病毒性肝炎、胰腺炎等^[3], 这种长期或慢性的炎症环境已成为突变积累的沃土^[4], 突变积累又可导致肿瘤的发展^[5]。因此及时解决炎症过程被视为降低罹患癌症风险的机制之一, 可能仅仅消灭炎症过程就可以降低癌症发病率和癌症相关死亡率^[6], 如环氧化酶抑制剂的使用可以降低乳腺癌的发病率、抑制肿瘤体积、质量的增加^[7-9]。这些非甾体类抗炎药通过抑制环氧化酶的活性, 抑制花生四烯酸中前列腺素的生

成, 治疗炎症、发烧和疼痛^[10], 同时还可以通过抑制血管的生成和诱变来降低癌症风险, 并进一步通过减少前列腺素的合成来促进细胞凋亡, 减弱肿瘤的侵袭和变性^[11-14]。而前列腺素的过度表达常见于全球大约 1/3 的乳腺癌患者中^[15], 这使得非甾体类抗炎药在癌症的预防和治疗中越来越受到大家的重视。舒林酸作为一种非甾体类抗炎药, 可以降低肿瘤微环境中的炎症因子和免疫抑制因子^[16], 其代谢产物可以进一步地抑制癌症的发生^[17]。然而由于大多非甾体类抗炎药在水中溶解度较低, 往往只能通

收稿日期: 2019-10-13

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: 王一安 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型。Tel:(010)57833264 E-mail: tieningxin@163.com

*通信作者 王向涛 (1973—), 研究员, 博士, 主要从事药物创新剂型研究。Tel:(010)57832366 E-mail: xtaowang@163.com

过口服给药, 这种给药方式降低了舒林酸在肿瘤组织的分布和被吸收能力, 因此提高舒林酸的被摄取能力或许可以更好地发挥舒林酸的抗肿瘤作用。根据诺伊斯-惠特尼方程 $V=KcA(Cs-Ct)$, Kc : 常数; Cs : 饱和溶解度; Ct : 药物浓度; A : 比表面积^[18], 药物的溶出效应 (V) 与比表面积 (A) 呈正比, 所以降低药物粒径、增加比表面可以提高药物的溶解速度和生物利用度。除此以外, 纳米级的药物颗粒更有利于药物被细胞吸收^[19]。因此本研究进行了舒林酸纳米混悬剂的制备和体内外抗肿瘤研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SCQ3201 超声波清洗器 (上海声彦超声仪器有限公司); Buchi R-3 旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi); JEM-1400 80KV 透射电镜 (日本电子株式会社); Bio Tekuquant 酶标仪 (USA); Nano-ZS90 马尔文粒度仪 (英国马尔文设备公司); MCA-15AC 细胞培养箱 (SANYO); AL204 电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司)

1.2 材料

舒林酸 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 38194-50-2); 维生素 E 琥珀酸聚乙二醇酯 (TPGS, 西安海斯夫生物科技有限公司, 批号 20151203); 异丙醇 (SPC, 沈阳天峰生物制药有限公司, 批号 SY-SI-170401); 泊洛沙姆 F-68 (P-188, 中国西格玛有限公司, 批号 018K0029); 聚乙二醇单甲醚 2000-聚乳酸-羟基乙酸 2000 (mPEG 2000-PLGA 2000, 济南岱罡生物工程有限公司); 实验用水是经过纯水仪净化过的纯水, 其余试剂均为分析级别

1.3 动物及细胞培养

雌性 Balb/c 小鼠, SPF 级, 体质量 20 g 左右, 由北京维通利华动物技术有限公司提供。MCF-7 人乳腺癌细胞株、4T1 鼠乳腺癌细胞株均由北京协和医学院细胞中心提供。高糖 DMEM、RPMI1640 培养基、胎牛血清、青链霉素均购于美国 Gibco 公司。96 孔无菌培养板由美国 Corning 公司提供。

2 方法与结果

2.1 舒林酸纳米混悬剂的制备

2.1.1 稳定剂的筛选 通过反溶剂沉淀法制备舒林酸纳米粒。按照质量比 1:1 的比例, 分别称取 10 mg 舒林酸和 10 mg 的备选载体 (聚山梨酯 80、SPC、TPGS、mPEG2000-PLGA2000、P188) 溶于用 1 mL

无水乙醇中形成油相。超声作用下 (250 W、25 °C), 油相缓慢滴注入 10 mL 灭菌水中, 减压旋蒸除去无水乙醇, 用灭菌水将纳米混悬液的总体积精密滴定到 10 mL, 形成质量浓度为 1 mg/mL 的药液。

另外制备油酸钠为稳定剂的纳米混悬液时, 油酸钠溶于灭菌水中, 其他步骤同上。实验以纳米粒的粒径大小和多分散指数 (PDI) 为考察指标, 筛选可靠稳定的载体, 结果见表 1。当使用油酸钠为载体时, 无论是粒径大小还是 PDI 值都处在一个较好的范围内, 表明油酸钠对舒林酸具有更好的亲和力, 可以形成较为可靠稳定的纳米分散体。更重要的是, 油酸钠可以调节细胞膜的流动性, 增强药物的细胞膜穿透能力, 提高药物对肿瘤细胞的杀伤作用^[20]。这一结果将体现在后文中体外细胞实验中。

表 1 不同载体搭载舒林酸后的纳米粒粒径和分散指数
Table 1 Particle size and PDI of sulindac nanoparticles by different carriers

稳定剂	粒径/nm	PDI
聚山梨酯 80	1 194.0±344.1	0.872±0.222
SPC	321.6±40.38	0.563±0.148
TPGS	660.6±67.09	0.674±0.303
mPEG2000-PLGA2000	289.7±3.164	0.191±0.010
P188	1 327.0±319.7	0.930±0.340
油酸钠	264.1±2.9	0.223±0.032

2.1.2 药载比的筛选 为了获得更高的载药量, 采用 2.1.1 筛选的处方进行单因素试验。不断提高药载比, 考察粒径和 PDI 值的变化, 见表 2。结果表明, 药载比 1:1、2:1、3:1、4:1, 随着药载比增高, 载体比例下降, 纳米粒的粒径和 PDI 值逐渐上升, 颗粒的团聚性能提高而溶解性能变差, 导致分散系内的稳定性下降。故确定最终制备方法中药载比为 1:1。

表 2 不同药载比对舒林酸纳米混悬液粒径和分散指数的影响
Table 2 Effect of different drug loading ratio on particle size and PDI of Sulindac Nanosuspension

药载比	粒径/nm	PDI
1:1	264.1±2.9	0.223±0.032
2:1	376.6±8.8	0.348±0.066
3:1	1 216±238.1	0.899±0.089
4:1	1 652±123.6	0.832±0.340

2.2 舒林酸纳米混悬液的物理表征

2.2.1 粒径、电位、PDI 考察 将制备好的舒林酸纳米混悬剂稀释 10 倍后,使用马尔文粒度仪测定粒径、电位和 PDI 指数。测定温度为室温,激光激发波长 633 nm,散射角 90°;每个样品平行测定 3 份,结果见图 1。舒林酸纳米混悬液的粒径、PDI 和电位值分别为 (264.1 ± 2.9) nm、 (0.223 ± 0.032) 、 (-56.4 ± 1.63) mV。粒径 PDI 小于 0.3,说明纳米混悬液中纳米粒较为集中,没有较大微米级颗粒出现,使得舒林酸纳米混悬液能够均一稳定的存在于分散体系中。一般在肿瘤组织中,血管具有更大的通透性,更容易允许几百纳米大小的物质渗出,再加上淋巴引流的缺失,形成的纳米颗粒更容易累积在肿瘤组织中^[21-22],这种增强的通透性和保留性被称为 EPR 效应^[23]。因此纳米药物大多可以利用 EPR 效应实现对肿瘤组织的被动累积,提高疗效。从数据测定结果来看,制备的舒林酸纳米混悬液粒径和分散均匀度都处于较好的状态,有利于提高舒林酸的被细胞吸收能力和肿瘤组织的被动靶向能力。

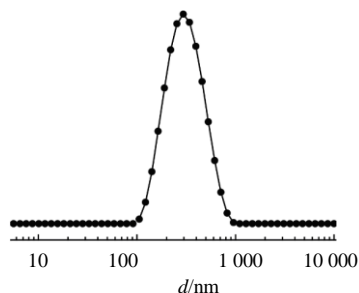


图 1 舒林酸纳米混悬液的粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of sulindac nanosuspension

2.2.2 纳米粒的形态观察 使用透射电镜对制备的舒林酸纳米粒的形状进行观察,用去离子水将纳米粒稀释成 0.01~0.02 mg/mL 的溶液,取 20 μ L 上述溶液滴加在电镜铜网上,静置 30 min 后,用滤纸吸去多余液体,自然晾干 30 min,滴加 10 μ L 2.0% 磷钨酸染液染色 15 min 后,用滤纸吸去多余液体,自然晾干后,在透射电镜下观察舒林酸纳米粒粒子的形态,见图 2。

舒林酸纳米粒的颗粒形状均为球形,在电镜纳米标尺度量下粒径都小于 200 nm,比动态激光法测定的粒径要小。两种测量方法得出的粒径差异主要是由于采用动态激光散射法测量粒径时,是在以水

为分散介质的环境中进行的,由于受水动力直径的影响^[24],纳米粒粒径的测量更偏向于大颗粒,而透射电镜观察法是在无水环境下进行的,测定结果排除了水化膜的影响,所以测定的结果偏小。

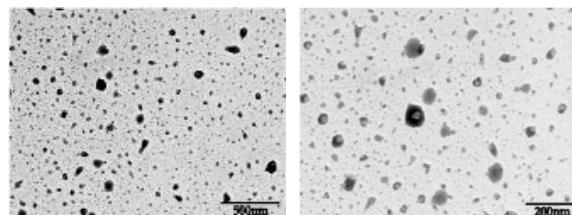


图 2 舒林酸纳米粒的电镜形态图

Fig. 2 Electron microscopic morphology of sulindac nanosuspensions

2.3 舒林酸纳米粒对 MCF-7 细胞系增殖抑制实验

采用 MTT 比色法评价舒林酸纳米粒对人源乳腺癌 MCF-7 细胞系增殖的抑制作用。MCF-7 细胞株生长于 DMEM 完全培养基中(包含 10% 的胎牛血清和 1 000 U/mL 的青链霉素)。4T1 细胞株生长于 RPMI 1640 完全培养基(包含 10% 的胎牛血清和 1 000 U/mL 的青链霉素)。在 37 $^{\circ}$ C 下,在含 5% 的 CO₂ 的培养箱中进行培养,隔 24 h 换液 1 次,待细胞生长到对数生长期后,以 8 000 个/孔的细胞浓度接种于 96 孔板,分别设定对照组、调零组和给药组。继续在培养箱中培养 24 h 后,将其取出,吸去 96 孔板中的完全培养基,给药组细胞滴加 150 μ L 用不完全培养基(其中只含 1 000 U/mL 的青链霉素)稀释的不同浓度的药液;对照组和调零组滴加等体积的不完全培养基。继续在培养箱中培育 48 h 后,向每孔内滴加 20 μ L 的含有 MTT 的 PBS 溶液(5 mg/mL)。接着在培养箱内培育 4 h 后,吸去孔内的上清液,每孔加入 150 μ L DMSO 溶剂,震荡溶解后,在 570 nm 波长下使用酶标仪测定各实验组的吸光度(A)值,计算细胞的抑制率,通过 GraphPad Prism 5.0 计算 IC₅₀ 值。以药物的浓度为横坐标,对细胞的抑制率为纵坐标绘制剂量-效应曲线,通过 GraphPad Prism 5.0 软件计算细胞抑制率,其中抑制效率达到 50% 的药物浓度,为半数抑制浓度。舒林酸纳米粒对 MCF-7 细胞系增殖抑制实验结果见表 3。

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{(A_e - A_0)}{(A_c - A_0)}$$

A_e 为给药组的吸光度值, A_c 为对照组的吸光度值, A₀ 为调零组的吸光度值

表3 舒林酸纳米粒对乳腺癌 MCF-7、4T1 细胞的抑制率

Table 3 Inhibition rate of sulindac nanoparticles on breast cancer MCF-7 and 4T1 cells

浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抑制率/%			
	MCF-7 细胞		4T1 细胞	
	舒林酸-DMSO	舒林酸纳米粒	舒林酸-DMSO	舒林酸纳米粒
1	8.3 \pm 5.2	7.8 \pm 3.3	5.8 \pm 3.3	-3.3 \pm 2.6
5	11.0 \pm 3.3	11.7 \pm 6.8	13.1 \pm 3.9	3.9 \pm 2.9
10	24.3 \pm 6.9	24.4 \pm 2.1	15.0 \pm 4.4	15.9 \pm 4.3
20	32.0 \pm 4.7	51.3 \pm 5.4	18.0 \pm 4.0	54.0 \pm 5.2
50	35.8 \pm 3.7	60.0 \pm 2.6	36.6 \pm 1.3	98.0 \pm 2.1
100	55.1 \pm 0.7	85.8 \pm 3.5	55.5 \pm 5.6	96.9 \pm 1.9
IC ₅₀	98.3 \pm 3.4	22.1 \pm 4.6**	88.4 \pm 3.8	19.2 \pm 1.2###

与舒林酸-DMSO MCF-7 细胞组比较: ** $P < 0.01$; 与舒林酸-DMSO 4T1 细胞组比较: ### $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs sulindac-DMSO MCF-7 cell group; ### $P < 0.01$ vs sulindac-DMSO 4T1 cell group

舒林酸对乳腺癌细胞 MCF-7、4T1 的抑制作用表现出剂量相关性,高剂量时抑制作用良好,低剂量时抑制作用并不明显,有时还会产生促进作用。同等剂量下相比较于原料药,舒林酸纳米粒对 MCF-7、4T1 细胞的抑制作用得到显著增强,具有更低的 IC₅₀ 值,分别为(22.1 \pm 4.6)、(19.2 \pm 1.2) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在细胞膜上,脂质的种类和相对丰度调控膜蛋白的定位和活性^[25],通过诱导细胞膜的变化,可以对它们所调控的生命活动过程产生影响^[26]。油酸钠作为单脂肪酸的衍生物,当其作为载体提高药物溶解度的同时还可以通过调节细胞膜的结构来增强药物对细胞膜的杀伤作用^[20,27],如氨苄西林(最低抑菌浓度 0.1 mg/mL)与油酸钠(0.03 mg/mL)联用对已建立的生物膜具有显著的破坏作用^[28]。这些效应结合纳米粒易被细胞摄取的优势使得舒林酸纳米粒相比于游离药具有更显著的抗肿瘤作用。使用 SPSS 软件进行单因素方差分析来进行实验组之间的统计分析,结果纳米粒组的 IC₅₀ 值与游离药比较差异具有极显著性 ($P < 0.01$)。可见利用制剂技术将舒林酸制备成粒径在 200 nm 左右的纳米粒后,可以增强其被细胞吸收的能力,这与已有的研究报道相似。

2.4 舒林酸纳米粒对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤抑制作用

4T1 细胞株生长于 RPMI 1640 完全培养基中,在 37 °C 下含 5% 的 CO₂ 的培养箱中培养到对数生长期后,将 4T1 细胞用胰酶消化富集后使用 PBS 分散成细胞悬液,27 只 Balb/c 小鼠按照 10⁷ 个/mL 的细胞浓度,在每只小鼠右前肢下侧皮下注入 0.2 mL 4T1 细胞悬液,建立 4T1 乳腺癌小鼠模型。在接种一周后采用游标卡尺分别测量每只小鼠的肿瘤的长(b)、宽(a),按照公式 $V = a^2b/2$ 计算肿瘤体积(V),

待肿瘤体积长到 100 mm³ 左右后,选取肿瘤大小均匀的小鼠分成 3 组,每组 6 只。分别作为对照组(每天腹腔注射 0.2 mL 生理盐水)、阿霉素组(每隔 1 d 尾静脉注射 0.2 mL 阿霉素注射液,3 mg/kg)和舒林酸纳米混悬剂组(每天腹腔注射 0.2 mL 舒林酸纳米混悬剂,20 mg/kg)。连续给药 14 d 后,脱颈椎处死小鼠,解剖出完整瘤块,进行称定质量,按照抑瘤率 = (对照组 - 舒林酸纳米混悬剂组) / 对照组计算抑瘤率。使用 SPSS 软件的单因素方差分析进行实验组之间的统计分析。

在给药期间内,与对照组比较,舒林酸纳米混悬剂和阿霉素组均对肿瘤的生长产生了一定的抑制效果。在肿瘤生长初期,舒林酸纳米粒对肿瘤的生长抑制作用并不明显,进入肿瘤生长中期抑制效果逐渐显现,进入生长后期抑制效果又逐渐下降,这可能是由于随着肿瘤生长进入中期,周围组织中的炎症增加,舒林酸纳米粒通过抑制炎症的发生抑制肿瘤体积的增加。进入肿瘤生长后期,随着炎症的进一步加重,超出了舒林酸的抑制范围,造成抑制作用的下降,这似乎说明在体内环境中,舒林酸纳米粒可直接诱导肿瘤细胞凋亡的作用并不显著。见图 3。

另外可以看到,阿霉素组随着给药次数的增加,小鼠的体质量出现逐渐下降的趋势,这或许与阿霉素的心脏毒性有关^[29]。与之相反,舒林酸纳米粒给药组的小鼠体质量并未出现下降趋势,预示了舒林酸纳米粒具有较好的安全性。见图 4。

肿瘤解剖图见图 5,计算得阿霉素组的抑瘤率为(51.0 \pm 9.8)%,舒林酸纳米混悬剂组的抑瘤率为(35.4 \pm 18.8)%。见表 4。

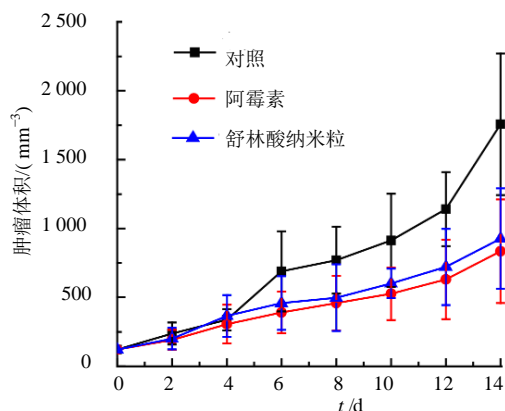


图 3 舒林酸纳米粒对荷瘤小鼠肿瘤体积影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of sulindac nanosuspensions on yumor volume changes in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

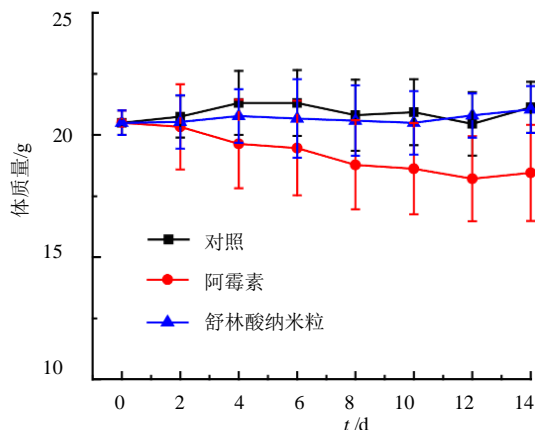


图 4 舒林酸纳米粒对荷瘤小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of sulindac nanosuspensions on weight changes in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

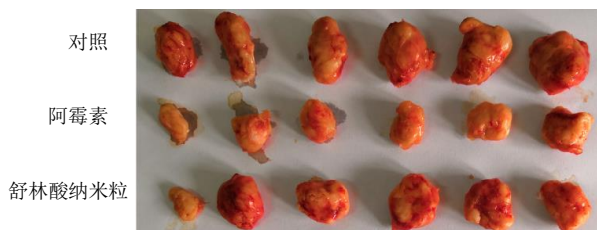


图 5 舒林酸纳米粒对荷瘤小鼠肿瘤解剖图的影响

Fig. 5 Effect of sulindac nanosuspensions on tumor anatomy in tumor-bearing mice

3 讨论

无论是临床中或临床前的研究，研究癌症的可变性都非常重要，而炎症作为癌症的特征之一，为肿瘤的发展、突变提供了丰厚的沃土，因此及时解决炎症过程被视为降低癌症风险的机制之一。

表 4 舒林酸纳米混悬液对 4T1 荷瘤小鼠的抑瘤率

Table 4 Inhibition rate of sulindac nanosuspension on 4T1 tumor-bearing mice

组别	瘤质量/g	抑瘤率/%
对照	1.78 ± 0.54	—
阿霉素	0.88 ± 0.23	51.0 ± 9.8
舒林酸纳米粒	1.15 ± 0.53	35.4 ± 18.8

关于非甾体抗炎药的抗肿瘤研究已经有了诸多报道，因此本实验选取了比较常见的非甾体抗炎药舒林酸，以油酸钠为稳定剂，进行了舒林酸纳米混悬剂的制备，并通过乳腺癌 MCF-7 细胞、4T1 细胞肿瘤模型进行体外药效评价，其抑制效果较游离药有了显著的提升 ($P < 0.01$)。之后采用 4T1 小鼠乳腺癌模型进行体内抗肿瘤评价，发现舒林酸纳米混悬剂具有一定的抗肿瘤效果但不是十分显著。然而需要注意的是，近年来两种或两种以上不同抗癌药物的联合治疗备受关注。联合治疗不但可以单独提高每种药物的疗效，而且还可以减少每种药物的剂量^[30]。这为抗肿瘤药物的减毒增效提供了新思路，因此可以考虑与非甾体抗炎药联合使用，在提高各自药效的同时又降低了化疗药物的使用剂量，减少临床中化疗药物的不良反应和毒性作用。舒林酸纳米混悬剂的制备从制剂手段提升了舒林酸的肿瘤抑制效果，拓宽了舒林酸的给药途径，并为其他非甾体类抗炎药纳米制剂的开发提供了借鉴作用，也为肿瘤治疗的增效减毒联合用药提供了更多选择。

参考文献

- [1] Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(3): 230-240.
- [2] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.
- [3] Bogaert T V, Bosscher K D, Libert C. Crosstalk between TNF and glucocorticoid receptor signaling pathways [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(4): 275-286.
- [4] Aggarwal B B, Vijayalekshmi R V, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(2): 425-430.
- [5] Balkwill F R, Mantovani A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(1): 33-40.
- [6] Chapman C G, Rubin D T. The potential for medical therapy to reduce the risk of colorectal cancer and

- optimize surveillance in inflammatory bowel disease [J]. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2014, 24(3): 353-365.
- [7] Su B, Cai X, Hong Y, *et al.* COX-2 inhibitor nimesulide analogs are aromatase suppressors in breast cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 122(4): 232-238.
- [8] Zhong B, Cai X, Yi X, *et al.* *In vitro* and *in vivo* effects of a cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide analog JCC76 in aromatase inhibitors-insensitive breast cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011, 126(1/2): 10-18.
- [9] Rothwell P M, Wilson M, Price J F, *et al.* Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials [J]. *Lancet*, 2012, 379(9826): 1591-1601.
- [10] Su B, Diaz-Cruz E S, Landini S, *et al.* Suppression of aromatase in human breast cells by a cyclooxygenase-2 inhibitor and its analog involves multiple mechanisms independent of cyclooxygenase-2 inhibition [J]. *Steroids*, 2008, 73(1): 104-111.
- [11] Su B, Chen S. Lead optimization of COX-2 inhibitor nimesulide analogs to overcome aromatase inhibitor resistance in breast cancer cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(23): 6733-6735.
- [12] Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, *et al.* The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies [J]. *Int J Cell Biol*, 2010, 2010: 1-21.
- [13] Thun M J, Henley S J, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(4): 252-266.
- [14] de Leval X, Julemont F, Benoit V, *et al.* First and second generations of COX-2 selective inhibitors [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2004, 4(6): 597-601.
- [15] Ashok V, Dash C, Rohan T E, *et al.* Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and breast cancer risk [J]. *Breast*, 2011, 20(1): 66-70.
- [16] Fischer J M, Schepers A G, Clevers H, *et al.* Occult progression by Apc-deficient intestinal crypts as a target for chemoprevention [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(1): 237-246.
- [17] Castonguay A, Rioux N. Inhibition of lung tumourigenesis by sulindac: comparison of two experimental protocols [J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(3): 491-496.
- [18] Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system [J]. *Int J Pharm*, 2006, 321(1/2): 1-11.
- [19] Al-Kassas R, Bansal M, Shaw J. Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs [J]. *J Control Release*, 2017, 260: 202-212.
- [20] Naasani I, Kohri N, Iseki K, *et al.* Improving the oral bioavailability of sulphiride by sodium oleate in rabbits [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1995, 47(6): 469-473.
- [21] Torchilin, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(3): 131-135.
- [22] Prabhakar U, Maeda H, Jain R K, *et al.* Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8): 2412-2417.
- [23] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS [J]. *Cancer Res*, 1986, 25(12): 865-869.
- [24] Varenne F, Makky A, Gaucher-Delmas M, *et al.* Multimodal dispersion of nanoparticles: a comprehensive Evaluation of size distribution with 9 size measurement methods [J]. *Pharm Res*, 2016, 33(5): 1220-1234.
- [25] Vögler O, Casas J, Capó D, *et al.* The Gbetagamma dimer drives the interaction of heterotrimeric Gi proteins with nonlamellar membrane structures [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(35): 36540-36545.
- [26] Escrivá P V. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine [J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(1): 34-43.
- [27] Yang Q, Alemany R, Casas J, *et al.* Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(1): 210-217.
- [28] Mohamed A M H A, Vladimirovna S N, Grigorievich Z V, *et al.* Sodium oleate increases ampicillin sensitivity in methylophilus quaylei biofilms on teflon and polypropylene [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2019, 20(3): 261-270.
- [29] Carvalho C, Santos R X, Cardoso S, *et al.* Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(25): 3267-3285.
- [30] Hu T, Cao H, Yang C, *et al.* LHD-modified mechanism-based liposome coencapsulation of mitoxantrone and prednisolone using novel lipid bilayer fusion for tissue-specific colocalization and synergistic antitumor effects [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(10): 6586-6601.