

葫芦素 B-聚乳酸-羟基乙酸共聚物载药纳米粒的构建与药效学评价

方 宁

咸阳职业技术学院, 陕西 咸阳 712000

摘要: 目的 以聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 作为纳米制剂载体材料将葫芦素 B 制备成纳米粒, 并考察其对 HepG2 肝癌细胞的抑制效果。方法 使用乳化溶剂蒸发法制备葫芦素 B-PLGA 载药纳米粒, 以 PLGA 浓度 (X_1)、PVA 浓度 (X_2) 和药物浓度 (X_3) 作为考察因素, 以载药纳米粒的粒径大小 (Y_1) 和包封率 (Y_2) 作为评价指标, 应用中心复合设计-效应面法优化葫芦素 B-PLGA 载药纳米粒处方; 测定了纳米粒的粒径分布和 Zeta 电位值, 通过透射电镜观察其微观形态, 并考察了葫芦素 B-PLGA 载药纳米粒的体外药物释放特性; 比较了葫芦素 B 与葫芦素 B-PLGA 载药纳米粒对 HepG2 肝癌细胞的抑制效果。结果 葫芦素 B-PLGA 载药纳米粒的最优处方组成为: PLGA 浓度为 9.0%, PVA 浓度为 2.0%, 药物浓度为 4.5%, 制备的纳米粒粒径为 (145.4 ± 15.8) nm, Zeta 电位值为 (-7.6 ± 0.8) mV; 透射电镜下可观察到纳米粒表面光滑, 分布均匀; 葫芦素 B-PLGA 载药纳米粒释药前期出现突释, 后期平缓, 48 h 药物释放达到 86%; 葫芦素 B-PLGA 载药纳米粒对 HepG2 肝癌细胞的抑制作用显著高于葫芦素 B。结论 葫芦素 B-PLGA 载药纳米粒可延缓药物释放, 提高对 HepG2 肝癌细胞的抑制活性, 为进一步临床研究奠定实验基础。

关键词: 葫芦素 B; PLGA 载药纳米粒; 中心复合设计-效应面法; HepG2 肝癌细胞

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 08-1557-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.08.012

Construction and pharmacodynamic evaluation of cucurbitacin B-loaded PLGA nanoparticles

FANG Ning

Xianyang Vocational College, Xianyang 712000, China

Abstract: **Objective** To prepare cucurbitacin B-loaded PLGA nanoparticles by using PLGA as carrier material, and to investigate its inhibitory effect on HepG2 liver cancer cells. **Methods** The cucurbitacin B-loaded PLGA nanoparticles were prepared by emulsion solvent evaporation method. Taking PLGA concentration (X_1), PVA concentration (X_2) and drug concentration (X_3) as the investigation factors, the particle size (Y_1) and encapsulation efficiency (Y_2) of cucurbitacin B-loaded PLGA nanoparticles were used as evaluation indexes. The central composite design-response surface methodology (CCD-RSM) was applied to optimize the formulation of cucurbitacin B-loaded PLGA nanoparticles. The particle size distribution and Zeta potential value were determined. The microscopic morphology was observed by transmission electron microscopy. The *in vitro* drug release characteristics of cucurbitacin B-loaded PLGA nanoparticles were investigated. The inhibitory effects of cucurbitacin B and cucurbitacin B-loaded PLGA nanoparticles on HepG2 liver cancer cells were compared. **Results** The optimal formulation of cucurbitacin B-loaded PLGA nanoparticles was: PLGA concentration of 9.0%, PVA concentration of 2.0%, drug concentration of 4.5%. The particle size of (145.4 ± 15.8) nm, and zeta potential of (-7.6 ± 0.8) mV. Transmission electron microscopy showed that the nanoparticles were smooth and uniform in size. The release of cucurbitacin B-loaded PLGA nanoparticles was fast in the early stage, and the late release was slow. Finally, the drug release was 86% within 48 hours. The inhibitory effect of cucurbitacin B-loaded PLGA nanoparticles on HepG2 liver cancer cells was significantly higher than that of cucurbitacin B. **Conclusion** The cucurbitacin B-loaded PLGA nanoparticles could delay drug release and increase the inhibitory activity of HepG2 liver cancer cells, which lays the experimental foundation for further clinical research.

Key words: cucurbitacin B; PLGA nanoparticles; central composite design-response surface methodology; HepG2 liver cancer cells

收稿日期: 2019-01-14

第一作者: 方宁(1979—),女,研究生,讲师,研究方向为中西医结合免疫学。Tel: 15229056633

葫芦素(cucurbitacin)是从葫芦科植物中提取的一类高度氧化的四环三萜类化合物,至今已发现几十种^[1]。其中葫芦素B应用最为广泛,临床上主要用于治疗原发性肝癌和肝炎^[2]。然而由于葫芦素B水溶性极低(水中溶解度仅为0.155 μg/mL)^[3],其片剂的溶出度/生物利用度均存在一定问题,且毒副作用比较严重^[4],因此有必要将葫芦素B开发成高效、低毒的制剂以便于在临床上发挥其更大的治疗价值。聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)是美国FDA批准的可用于注射的药用辅料,属于一种可生物降解的高分子化合物,在生物体内可分解成乳酸和羟基乙酸,并进一步经过三羧酸循环降解成二氧化碳和水,无毒副作用,且生物相容性良好,已应用于伤口缝合、体内植入、皮肤移植、微球、纳米给药系统^[5]等生命科学领域。本研究以PLGA作为纳米制剂载体材料将葫芦素B制备成纳米粒,以提高葫芦素B的溶解性,增强对肝癌细胞的靶向性,为进一步临床研究奠定实验基础。

1 仪器与材料

L-3000系列高效液相色谱系统(北京普源精仪科技有限公司);AE124C万分之一电子天平(上海恒平科学仪器有限公司);SZCL型系列恒温加热磁力搅拌器(上海增森仪器科技有限公司);RE-52A旋转蒸发器(上海增森仪器科技有限公司);Malvern Zetasizer Nano型动态激光散射仪(英国Malvern公司);LVEM5台式透射电子显微镜(Quantum Design 中国公司);Allegra X-64R高速台式冷冻离心机(贝克曼库尔特生命科学事业部);LHS-70SC恒温恒湿培养箱(上海天呈实验仪器制造有限公司)。

葫芦素B(成都昂赛思生物科技有限公司,批号130316,纯度95.4%);葫芦素B对照品(中国食品药品检定研究院,批号111945-201301,纯度96.9%);聚乳酸-羟基乙酸共聚物(LA/GA 50:50, Mw=10 000,批号09062514,山东医疗器械研究所);聚乙烯醇(PVA,可乐丽国际贸易上海有限公司,批号9471205);二氯甲烷(西格玛中国公司,批号1730800);四甲基偶氮唑盐(MTT,广州翔博生物科技有限公司,批号4837291);HepG2人肝癌细胞(上海歌凡生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为Diamonsil C₁₈柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm, 迪马公司),流动相为乙腈-水(50:50),柱温35℃,体积流量1 mL/min,进样量20 μL。

2.2 葫芦素B-PLGA载药纳米粒的制备

参照文献^[6]并结合预实验结果,本研究采用乳化溶剂蒸发法制备葫芦素B-PLGA载药纳米粒。制备工艺如下:取处方量的葫芦素B溶解到5 mL二氯甲烷中,再加入处方量PLGA,超声溶解,作为油相;另取处方量的PVA加入到20 mL蒸馏水中,搅拌溶解,作为水相;水相中加入搅拌磁子,开启磁力搅拌,搅拌速度为4 000 r/min,让液面呈旋涡状,使用带有5号针头的注射器将油相缓慢滴加到水相中,滴加完后继续搅拌10 min,形成乳状溶液;将全部液体加入到旋转蒸发仪中,水浴温度设置为50℃,磁力搅拌速度设置为2 500 r/min,旋蒸挥干二氯甲烷,使用0.45 μm微孔滤膜滤过,加入蒸馏水调整体积至20 mL,即得到葫芦素B-PLGA载药纳米粒,冰箱4℃保存。

2.3 粒径分布和Zeta电位测定

使用Malvern Zetasizer Nano型动态激光散射仪测定葫芦素B-PLGA载药纳米粒的粒径分布和Zeta电位,仪器检测参数设置为:氦氖激光发射器功率为5 mW,激发光波长为633 nm,环境温度为25℃,测试角度为90°,检测时间为80 s。用移液枪取约10 μL葫芦素B-PLGA载药纳米粒加入到聚苯乙烯比色杯中,再加入2.5 mL蒸馏水,轻轻振摇,分散均匀,放入到仪器中分别测定粒径分布和Zeta电位,所有样品均测定3次,取平均值。

2.4 包封率测定

参照文献^[7],本研究采用低温超速离心法测定葫芦素B-PLGA载药纳米粒包封率。将4.0 mL葫芦素B-PLGA载药纳米粒加入到超速离心管中,15 000 r/min离心60 min,离心管上层为澄清透明溶液,底部为白色胶状沉淀。吸取全部上清液,剩余在底部残留沉淀物用4 mL乙腈溶解后转移至50 mL棕色量瓶中,加入流动相定容,使用“2.1”项下HPLC色谱条件测定药物含量($W_{\text{包封}}$);另取4.0 mL葫芦素B-PLGA载药纳米粒加入到50 mL棕色量瓶中,加入10 mL乙腈振摇溶解,溶液呈透明状,加入流动相定容,使用HPLC法测定药物含量($W_{\text{总}}$)。根据公式计算葫芦素B-PLGA载药纳米粒包封率。

$$EE(\%) = (W_{\text{包封}} / W_{\text{总}}) \times 100\%$$

2.5 葫芦素B-PLGA载药纳米粒处方优化

本研究采用中心复合设计-效应面法优化葫芦素B-PLGA载药纳米粒处方^[8-9],考察PLGA质量浓度(X_1)、PVA质量浓度(X_2)和药物质量浓度(X_3)对粒径分布(Y_1)和包封率(Y_2)的影响,3个因素水平见表1,根据实验软件给出的20个不同处方进行实验(表2)。

表1 中心复合设计-效应面法中变量及水平

Table 1 Variables and levels in central composite design-response surface methodology

变量	水平			响应	目标值
	低(-1)	中(0)	高(+1)		
X_1 : PLGA 浓度(%)	5	10	15	Y_1 : 粒径大小(nm)	最小
X_2 : PVA 浓度(%)	1	2	3	Y_2 : 包封率(%)	最大
X_3 : 药物浓度(%)	2	5	8		

表2 实验设计及结果

Table 2 Experimental design and results

No.	变量			响应值	
	X_1 /%	X_2 /%	X_3 /%	Y_1 /nm	Y_2 /%
1	10	2	5	213.5	93.2
2	10	2	0.43	162.2	96.8
3	5	3	2	163.6	88.6
4	5	1	8	178.4	75.3
5	2.37	2	5	146.3	68.4
6	15	1	8	244.1	90.5
7	5	1	2	158.4	78.9
8	10	0.48	5	193.2	79.1
9	15	3	2	235.7	96.7
10	10	2	5	210.4	95.8
11	10	2	9.57	234.4	85.7
12	17.62	2	5	271.5	95.8
13	10	3.52	5	204.3	94.2
14	15	3	8	243.1	93.4
15	5	3	8	192.6	76.7
16	10	2	5	222.9	95.3
17	10	2	5	210.3	92.4
18	10	2	5	212.3	92.7
19	10	2	5	211.8	93.1
20	15	1	2	236.7	96.7

使用中心复合设计软件对实验结果(表2)进行方差分析,根据模型回归系数(表3)和方差分析结果(表4)评价模型的显著性以及变量之间的相互作用。由表3模型回归结果可知, Y_1 、 Y_2 模型 P 值均小于0.000 1,说明模型显著性极高; Y_1 、 Y_2 模型相关系数 R^2 分别为0.943 2和0.945 1,均大于0.900 0,说明模型可信度较好; Y_1 、 Y_2 模型失拟项 P 值分别为0.256 3和0.308 8,均大于0.05,说明模型预测性较好。

表4方差分析结果显示,PLGA浓度和药物浓度对葫芦素B-PLGA载药纳米粒的粒径分布具有显著影响($P<0.05$)。通过效应面图(图1)可知,粒径大小与PLGA浓度和药物浓度均呈正相关,即当

表3 模型回归系数结果

Table 3 Result of regression coefficient of model

响应		平方和		F 值		P 值
		Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	
Y_1	模型	19641.03		18.46		<0.000 1
	残差	1181.89				
	失拟项	1068.72		1.44		0.256 3
	纯误差	113.17				
	总和	20822.91				
	R^2	0.9432				
Y_2	模型	1284.17		19.11		<0.000 1
	残差	74.66				
	失拟项	68.72		1.15		0.308 8
	纯误差	5.95				
	总和	1358.83				
	R^2	0.9451				

表4 方差分析结果

Table 4 Analysis of variance

来源	平方和		F 值		P 值	
	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
X_1	16546.11	783.87	140.00	104.99	<0.0001	<0.0001
X_2	93.14	108.36	0.79	14.51	0.3955	0.0034
X_3	2390.22	138.95	20.22	18.61	0.0011	0.0015
X_1X_2	57.24	8.40	0.48	1.13	0.5023	0.3136
X_1X_3	146.20	4.50	1.24	0.60	0.2921	0.4555
X_2X_3	10.13	3.64	0.086	0.49	0.7757	0.5007
X_1^2	0.33	184.77	0.0028	24.75	0.9588	0.0006
X_2^2	189.86	51.24	1.61	6.86	0.2337	0.0256
X_3^2	207.80	0.43	1.76	0.057	0.2143	0.8160

PLGA浓度和药物浓度均较低时,制备的纳米粒粒径较小,而随着PLGA浓度和药物浓度的逐渐增加,粒径逐渐增大。 Y_1 二次多项式拟合方程为: $Y_1=212.59+36.17X_1+2.71X_2+13.75X_3-2.67X_1X_2-4.27X_1X_3+1.13X_2X_3+0.18X_1^2-4.19X_2^2-4.38X_3^2$ ($R^2=0.943 2$)。

表4方差分析结果显示,PLGA浓度、PVA浓度和药物浓度对葫芦素B-PLGA载药纳米粒的包封率具有显著影响($P<0.05$)。通过效应面图(图2)可

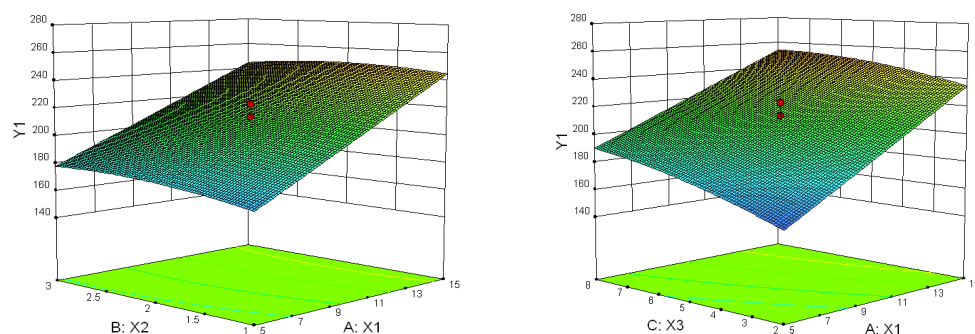


图1 PLGA浓度(X_1)、PVA浓度(X_2)和药物浓度(X_3)对粒径分布(Y_1)的效应面图

Fig.1 Response surface of PLGA concentration (X_1), PVA concentration (X_2) and drug concentration (X_3) on particle size distribution (Y_1)

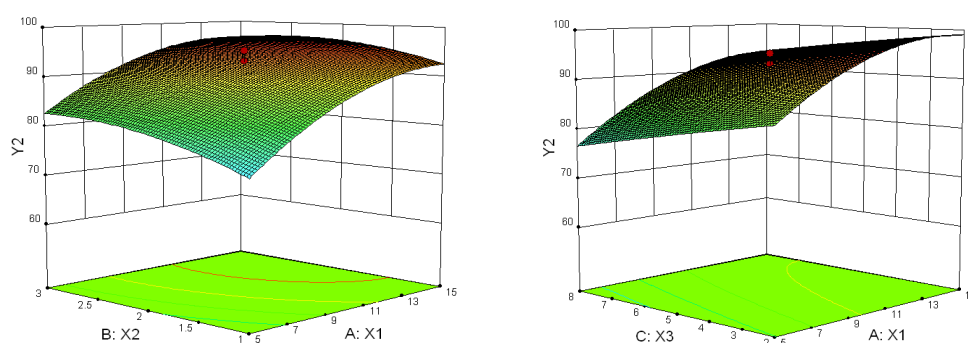


图2 PLGA浓度(X_1)、PVA浓度(X_2)和药物浓度(X_3)对包封率(Y_2)的效应面图

Fig.2 Response surface of PLGA concentration (X_1), PVA concentration (X_2) and drug concentration (X_3) on entrapment efficiency (Y_2)

知,包封率与PLGA浓度和PVA浓度均呈正相关,即PLGA浓度和PVA浓度较低时包封率较小,随着PLGA浓度和PVA浓度的逐渐增加,包封率逐渐增大;而包封率与药物浓度呈负相关,药物浓度增加包封率降低。 Y_2 二次多项式拟合方程为: $Y_2=92.91+7.87X_1+2.93X_2-3.31X_3-1.02X_1X_2+0.75X_1X_3-0.67X_2X_3-4.13X_1^2-2.18X_2^2-0.20X_3^2$ ($R^2=0.9451$)。

葫芦素B-PLGA载药纳米粒的最优处方应具备粒径分布“最小”,包封率“最大”。经过中心复合设计实验软件处理得到葫芦素B-PLGA载药纳米粒最优处方组成为:PLGA浓度为9.0%,PVA浓度为2.0%,药物浓度为4.5%,粒径预测值为186.4 nm,包封率为94.4%(图3);根据最优处方连续制备3批葫芦素B-PLGA载药纳米粒,经测定粒径大小为 (184.7 ± 13.6) nm,包封率为 $(95.1\pm 1.7)\%$,预测值和实测值的粒径分布和包封率偏差均小于 $\pm 5.0\%$,构建的数学模型较为准确、可信。

2.6 葫芦素B-PLGA载药纳米粒表征

2.6.1 粒径分布和Zeta电位 按照“2.3”项下方法

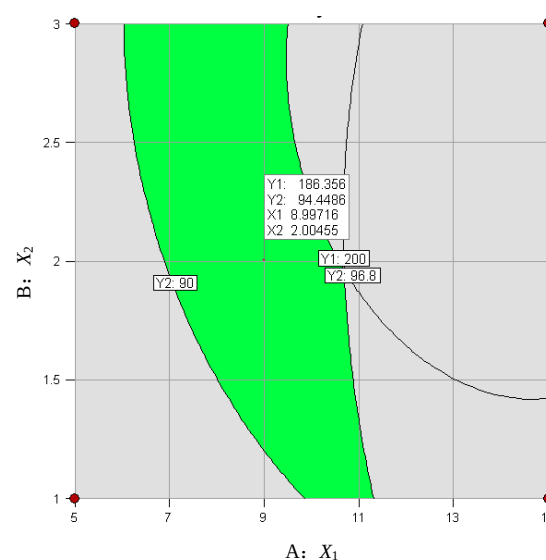


图3 葫芦素B-PLGA载药纳米粒处方的设计空间叠加图
Fig.3 Design space overlay of cucurbitacin B-PLGA drug-loaded nanoparticles

测定葫芦素B-PLGA载药纳米粒的粒径分布和Zeta电位(图4),由测定图谱可见,粒径图呈正态分布,

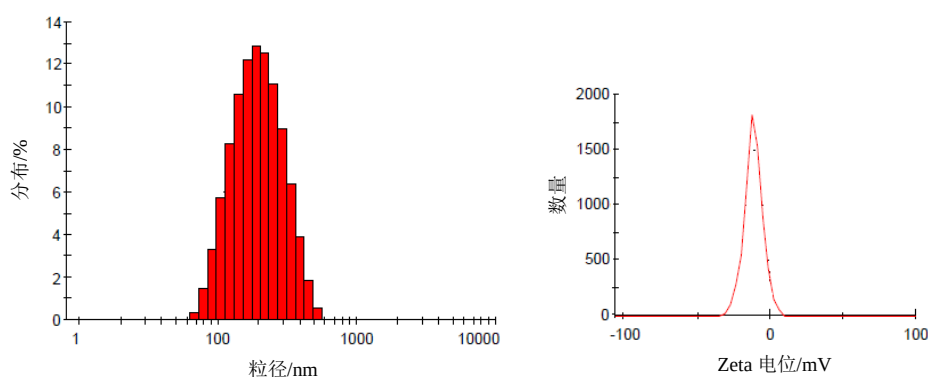


图4 葫芦素B-PLGA载药纳米粒粒径分布和Zeta电位

Fig. 4 Size distribution and zeta potential of cucurbitacin B-PLGA drug-loaded nanoparticles

粒径主要分布在100~300 nm,平均粒径为 (184.7 ± 13.6) nm, Zeta 电位值为 (-7.6 ± 0.8) mV, 纳米粒表面带有负电荷。

2.6.2 微观结构 按照最优处方制备一批葫芦素B-PLGA载药纳米粒,取一滴加入蒸馏水稀释,放入水浴中超声10 s,去除气泡,静置10 min,取一滴置于铜网上均匀平铺,加入1滴2%磷钨酸溶液负染10 min,用滤纸从液体边缘吸尽多于液体,在透射电镜下观察。从电镜照片(图5)可以看到,葫芦素B-PLGA载药纳米粒外观圆整、结构紧密、表面光滑、分布均匀、没有黏连、未见到药物晶体。

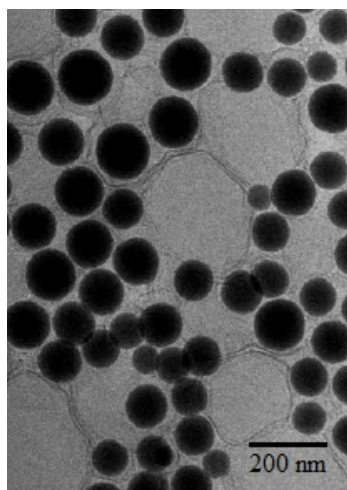


图5 葫芦素B-PLGA载药纳米粒透射电镜图

Fig. 5 Transmission electron microscopy of cucurbitacin B-PLGA drug-loaded nanoparticles

2.7 体外释放

通过考察葫芦素B-PLGA载药纳米粒在体外药物释放可以初步了解其在体内释药情况。反向透析法是评价纳米给药系统体外药物释放最常用的方式^[10],因此本研究采用反向透析法考察葫芦素B-

PLGA载药纳米粒的体外释药特征。将5 mL葫芦素B-PLGA载药纳米粒溶液装入预先处理好的透析袋中,系紧两端,放入到装有200 mL释放介质(介质为7.4磷酸盐缓冲溶液,加入0.5%聚山梨酯80)中,水浴温度设置为37°C(使用封口膜密封烧杯,防止水分蒸发),分别在1、2、4、6、8、12、16、24、48 h取出5 mL释放介质,同时补加同温同量空白介质,经0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液使用HPLC法测定药物含量,计算药物累积释放度,并绘制释放曲线,结果见图6。

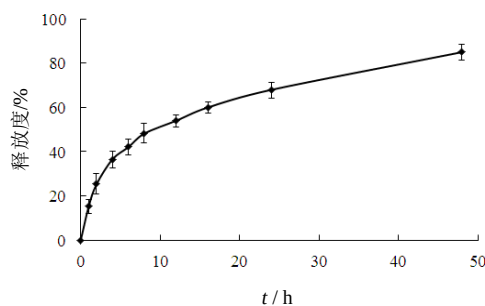


图6 葫芦素B-PLGA载药纳米粒体外释放曲线(n=3)

Fig. 6 Release curve of cucurbitacin B-PLGA drug-loaded nanoparticles *in vitro* (n=3)

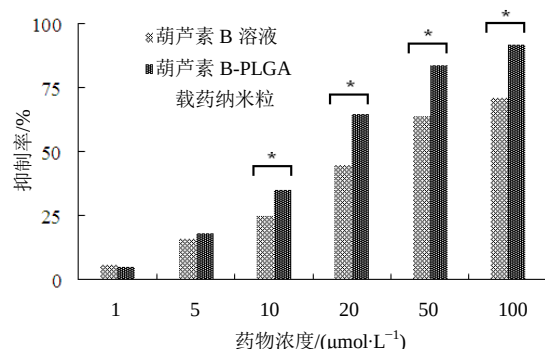
由释放曲线可知,葫芦素B-PLGA载药纳米粒在释药初期出现突释,在4 h药物释放量达到36%,这是游离药物和吸附在纳米粒表面药物共同释放导致;而在后期药物释放较为平缓,这是包裹在纳米粒内部的药物通过扩散,或者载体材料溶蚀后药物释放所致,在48 h药物累积释放达到85%,这说明将葫芦素制备成PLGA载药纳米粒可以延缓药物释放,有望达到提高药物的疗效、降低药物毒副作用的目的。

2.8 体外抗癌活性评价

将HepG2肝癌细胞用含10%胎牛血清培养基培养,置37℃、5% CO₂培养箱中,每3~4天传代1次。选择处于对数生长期的细胞用于实验。取贴壁细胞用0.25%胰酶(含1 mmol/L EDTA)消化后悬浮于培养液中,调整细胞浓度为 2.5×10^4 /mL,按每孔100 μL接种于96孔板上,每孔设3个复孔。培养18~24 h待细胞贴壁后,分组加入0.5 μL 葫芦素B溶液(CuB Solution)、0.5 μL 葫芦素B-PLGA载药纳米粒(CuB-PLGA NPs)。另外,对照组只加入0.5 μL培养液,不加药物;空白组不含细胞,只加入0.5 μL培养液,不加药物。继续培养48 h后,每孔加入5 mg/mL MTT试剂10 μL,培养4 h,每孔加入DMSO 100 μL,培养箱内过夜。用酶标仪在570 nm波长处测定每孔的吸光度(*A*)值,根据*A*值求出细胞抑制率,计算公式为:

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{A_{\text{试验组}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白}}}\right) \times 100\%$$

葫芦素B溶液和葫芦素B-PLGA载药纳米粒对HepG2肝癌细胞的抑制率见图7。从图中可以看出葫芦素B溶液和葫芦素B-PLGA载药纳米粒对HepG2肝癌细胞的生长抑制作用均随剂量的升高而增强,当药物剂量达到10 μmol/L后含有相同剂量药物的葫芦素B-PLGA载药纳米粒对HepG2肝癌细胞的抑制作用强于葫芦素B溶液($P < 0.05$)。



与相同浓度的葫芦素B溶液比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs cucurbitacin B solution with the same concentration

图7 葫芦素B-PLGA载药纳米粒对HepG2肝癌细胞的抑制作用

Fig. 7 Inhibition of cucurbitacin B-PLGA loaded nanoparticles on HepG2 hepatoma cells

3 讨论

PLGA载药纳米粒的制备方法主要包括:溶剂扩散法、盐析法、超声法、纳米沉淀法、乳化溶剂蒸发法等^[11],本研究使用乳化溶剂蒸发法制备葫芦素

B-PLGA载药纳米粒,该工艺不需要使用特殊设备,操作简便,可以提高处方筛选效率。在确定了制备工艺后,通过中心复合设计-效应面法优化得到葫芦素B-PLGA载药纳米粒的最佳处方。在透射电镜下可观察到载药纳米粒外观圆整、结构紧密、表面光滑、分布均匀,粒径大约为180 nm左右。载药纳米粒在释药初期表现出突释现象,4 h药物释放量达到36%,后期药物释放较为平缓,48 h药物累积释放达到85%。体外抗癌活性评价研究结果表明,当药物剂量达到10 μmol/L后含有相同剂量药物的葫芦素B-PLGA载药纳米粒对HepG2肝癌细胞的抑制作用强于葫芦素B溶液,这主要是由于葫芦素B以分子形式吸附和(或)包裹在纳米粒中,提高了葫芦素B的溶解度,当纳米粒与HepG2肝癌细胞接触后被吸附到肿瘤细胞表面释放药物,更有效抑制细胞增殖。

参考文献

- [1] 郭梦鸿,孙玉琦,刘影,等. 葫芦科植物药材中葫芦素类成分的含量差异 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(17): 1554-1558.
- [2] 蓝天,刘卫国,王晓稼. 葫芦素B抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(12): 2801-2803.
- [3] 刘克非,李晓峰,张雅昕,等. 葫芦素E溶解度、正辛醇-水及脂质体-水分配系数测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(11): 853-856, 875.
- [4] 刘颖菊,刘文清. 葫芦素的药理与临床应用 [J]. 中草药, 1992, 23(11): 605-608, 593.
- [5] Kapoor D N, Bhatia A, Kaur R, et al. PLGA: a unique polymer for drug delivery [J]. Therap Deliv, 2015, 6(1): 41-58.
- [6] 柳阳,朱艳华,孙佳琳,等. 聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸嵌段共聚物载药纳米粒制备方法的研究进展 [J]. 中国药房, 2017, 28(16): 2274-2277.
- [7] 李金明,李荣荣,田景振. Box-Behnken效应面法优化紫杉醇 mPEG-PDLLA 纳米粒处方工艺 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(8): 927-933.
- [8] 杨金艳,吴诗惠,罗明霞,等. 星点设计-效应面优化黄芩苷乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒制备工艺研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33(4): 75-80.
- [9] 冯博,承伟. 中心复合设计法优化制备丹参酮IIA鱼精蛋白纳米粒 [J]. 中成药, 2015, 37(11): 2534-2537.
- [10] 何静,邱妍川,杨延音,等. 水飞蓟素肠溶聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及体外释药研究 [J]. 中国药房, 2016, 27(34): 4842-4844.
- [11] 甘良春. 载带不同性质药物的PLGA纳米粒成型质量与规律的探讨 [D]. 成都: 四川大学, 2007.