

基于 mPEG-PCL 修饰的多西他赛脂质体的制备及体外抗肿瘤活性评价

侯盼盼¹, 杨春杰¹, 苏慧慧¹, 钱慧琴¹, 李柯儒¹, 崔 茜¹, 郭新红^{2*}

1. 豫北医学院 药学院, 河南 新乡 453003

2. 郑州大学 药学院, 河南 郑州 450001

摘要: **目的** 制备单甲氧基聚乙二醇 5000-聚己内酯 10000 (mPEG5000-PCL10000) 修饰的多西他赛 (DTX) 脂质体 (DTX-PLip), 并初步评价其体外抗肿瘤活性。**方法** 采用薄膜分散-水化法制备 DTX-PLip。以粒径、包封率 (EE)、载药量 (LC) 为评价指标, 通过单因素及正交试验优选 DTX-PLip 的最佳处方工艺; 研究 DTX-PLip 的透射电镜微观形态、粒径、 ζ 电位、EE 及 LC; 考察其在 4 °C 放置 21 d 内的稳定性; 采用透析法对 DTX-PLip 的体外释放特性进行研究; 采用 MTT 法评估 DTX-PLip 对小鼠乳腺癌 4T1 细胞的增殖抑制效应; 通过体外细胞摄取实验, 结合荧光显微镜观察与流式细胞术定量分析 4T1 细胞对 DTX-PLip 的摄取效率。**结果** DTX-PLip 最佳处方为 mPEG5000-PCL10000 用量 150 mg, DTX 用量 8 mg, 药脂比为 1:20, 胆脂比为 1:5。透射电子显微镜图片显示 DTX-PLip 具封闭囊泡结构, 平均粒径为 (82.13 ± 3.33) nm, ζ 电位为 (-15.70 ± 3.86) mV; EE 为 (89.34 ± 1.07) %, LC 为 (2.04 ± 0.02) %; 体外释放结果表明, DTX-PLip 72 h 体外累积释放率为 58%, 具有一定的缓释性, 4 °C 放置 21 d 内储存稳定; 细胞毒实验结果表明 DTX-PLip 对 4T1 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 (0.13 ± 0.01) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 均显著高于 DTX 溶液组和 DTX 脂质体 (DTX-Lip) 组 ($P < 0.001$), 具有良好的抗肿瘤活性; 荧光显微镜观察结果表明 DTX-PLip 在各个时间平均荧光强度均显著高于 DTX-Lip ($P < 0.01$), 流式细胞术结果表明, 与 DTX-Lip 相比, DTX-PLip 细胞摄取量显著增加 ($P < 0.001$)。**结论** DTX-PLip 表现出明显的缓释作用, 能增强 DTX 的抗肿瘤效果。

关键词: 多西他赛; 单甲氧基-聚乙二醇 (mPEG-PCL); 脂质体; 处方工艺; 抗肿瘤活性; 乳腺癌

中图分类号: R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2025)06-1546-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.06.015

Preparation and *in vitro* anti-tumor activity evaluation of docetaxel liposomes modified with mPEG-PCL

HOU Panpan¹, YANG Chunjie¹, SU Huihui¹, QIAN Huiqin¹, LI Keru¹, CUI Qian¹, GUO Xinhong²

1. College of Pharmacy, North Henan Medical University, Xinxiang 453003, China

2. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To prepare monomethoxy polyethylene glycol 5000- Polycaprolactone 10000 (mPEG5000-PCL10000) modified docetaxel (DTX) liposomes (DTX-PLip), preliminary evaluate the antitumor activity *in vitro*. **Methods** DTX-PLip was prepared by thin film dispersion-hydration method. The optimal prescription process of DTX-PLip was optimized by one-way and orthogonal tests using particle size, encapsulation efficiency (EE), and drug loading capacity (LC) as evaluation indexes, the transmission electron microscopy microstructure, particle size, ζ potential, EE, LC, and stability of the optimized DTX-PLip were investigated. The *in vitro* release characteristics of DTX-PLip were studied using dialysis method. MTT method was used to evaluate the inhibitory effect of DTX-PLip on the proliferation of mouse breast cancer 4T1 cells. Quantitative analysis of the uptake efficiency of DTX PLip by 4T1 cells was conducted through *in vitro* cell uptake experiments, combined with fluorescence microscopy observation and flow cytometry. **Results** The optimal formulation of DTX-PLip was mPEG5000-PCL10000 at 150 mg, DTX at 8 mg, with a drug-to-lipid ratio of 1:20 and a bile-to-lipid ratio of 1:5. Transmission electron microscopy images showed that DTX-PLip

收稿日期: 2025-01-15

基金项目: 河南省科技攻关项目 (242102310563); 河南省科技攻关项目 (232102310337); 新乡医学院三全学院生物与医药省级重点学科项目资助 (ZDXKXM019); 新乡医学院三全学院优秀青年教师培养计划 (SQ2023YQJH06)

作者简介: 侯盼盼, 女, 硕士, 讲师, 从事抗肿瘤药物新剂型研究。E-mail: houpnpan2022@163.com

*通信作者: 郭新红, 女, 博士, 副教授, 从事肿瘤靶向药物新剂型研究。E-mail: gxh371@126.com

had a closed vesicular structure, with an average particle size of (82.13 ± 3.33) nm and a ζ potential of (-15.70 ± 3.86) mV. EE was $(89.34 \pm 1.07)\%$, and LC was $(2.04 \pm 0.02)\%$. *In vitro* release results indicated that the cumulative release rate of DTX-PLip was 58% after 72 h, demonstrating a certain sustained-release property. It remained stable during storage at 4 °C for 21 d. The cytotoxicity assay results showed that the IC_{50} value of DTX-PLip against 4T1 cells was (0.13 ± 0.01) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, which was significantly higher than that of the DTX solution group and the DTX-Lip group ($P < 0.001$), indicating good anti-tumor activity. Fluorescence microscopy observations revealed that the average fluorescence intensity of DTX-PLip was significantly higher than that of DTX-Lip at each time point ($P < 0.01$). Flow cytometry results indicated that the cellular uptake of DTX-PLip was significantly increased compared with DTX-Lip ($P < 0.001$). **Conclusion** DTX-PLip demonstrated a significant sustained-release effect and could enhance the anti-tumor efficacy of DTX.

Key words: docetaxel; mPEG-PCL; liposomes; prescription process; anti-tumor activity; breast cancer

据世界卫生组织国际癌症研究机构发布的 GLOBOCAN 最新报告显示, 2022 年全球范围内有近 2 000 万例新癌症病例, 乳腺癌是仅次于肺癌的最常见的癌症, 约有 232 万新发病例 (11.6%)。预计 2050 年癌症病例将达到 3 500 万例^[1]。癌症已成为死亡的主要原因。

多西他赛 (DTX), 又名多西紫杉醇, 属于紫杉醇类抗肿瘤药, 其作用机制主要是通过抑制在细胞周期的 G₂/M 阶段抑制微管解聚进而破坏肿瘤细胞的有丝分裂进程, 达到抗肿瘤效果, 作为临床上使用的主要化疗药物之一, DTX 广泛应用于卵巢癌、晚期乳腺癌、肺癌和头颈癌等的治疗^[2-3]。然而该药物存在肾脏清除率快、水溶性差、体内分布缺乏选择性以及剂量相关性毒性等局限性^[4]。目前临床上常用的是 DTX 注射液, 虽然价格低; 但处方中作为溶剂的聚山梨酯-80 易引发超敏反应、神经毒性等不良反应^[5]。因此, 优化 DTX 的处方及剂型, 对于提高药物生物利用度、改善治疗效果和降低药物的不良反应具有重要意义。

脂质体作为新型靶向给药系统, 已成为抗肿瘤药物或基因类药物的重要载体。相较于其他纳米载体, 脂质体具有良好的生物降解性, 可有效将生物活性物质递送至细胞质内, 且不良反应小^[6]。目前研究热点主要聚焦于普通脂质体、免疫脂质体及聚乙二醇 (PEG) 修饰的脂质体 3 类。普通脂质体存在包封率 (EE) 低、稳定性差等问题, 进入体内循环后, 易被网状内皮组织系统 (RES) 吞噬, 且药物达肿瘤部位之前易发生泄漏; 免疫脂质体对不同抗原的 EE 效果存在显著性差异, 部分抗原的 EE 难以满足临床需求; 而 PEG 修饰的脂质体, 能够有效避免脂质体与体内内源性成分的结合, 改善药物的生物利用度。

两亲性聚合物材料单甲氧基聚乙二醇-聚己内

酯 (mPEG-PCL) 因具有良好的生物相容性和生物降解性, 及其结构特点和 PEG 的“隐形作用”, 已被广泛应用于胶束、纳米粒等纳米载体的制备^[7]。其结构中 mPEG 链段的生物相容性和亲水性使其能够锚定在磷脂双分子层的亲水界面, 而 PCL 的亲脂性, 能较好地融合于脂质体的疏水层中。这种嵌合特性不仅增强脂质体结构的完整性和稳定性, 还可避免因聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA)、聚乳酸 (PLA) 等强疏水性聚合物导致的膜结构破坏及药物泄露问题。此外, mPEG-PCL 修饰后的脂质体, 能避免 RES 的清除, 延长血液循环时间, 并通过高通透性和滞留效应 (EPR) 在肿瘤组织中富集^[8]。Xing 等^[9]制备的基于 mPEG-PCL 修饰的固体脂质纳米粒表明 mPEG 的抗蛋白吸附特性可延长药物循环时间, 也能增加难溶性药物的溶解度; PCL 与 DTX 产生的氢键的相互作用可提高药物在脂质体中的 EE, 增强抗肿瘤活性。但固体脂质体纳米粒制剂仍存在粒径较大、载药量 (LC) 低、药物突释等问题^[10]。到目前为止, 关于采用 mPEG-PCL 修饰脂质体的研究尚处于起步阶段。基于此, 本研究开发一种基于 mPEG-PCL 修饰的 DTX 脂质体 (DTX-PLip) 给药系统, 旨在优化制剂的粒径分布、EE、DL 及稳定性, 实现长效缓释, 为抗肿瘤药物递送提供新策略。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Mili-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); DV215CD 型电子天平 (美国奥豪斯公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); RE-52AA 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); JY92-II 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技有限公司); UltiMate3 000 型高效液相色谱仪 (美国 Thermo Scientific Technologies 公司); TCL-16G 型离心机 (上海安亭科学仪器

厂); Nano-Zs90 型激光纳米粒度分析仪(英国马尔文公司); CJ-2F 型医用净化工作台(苏州市冯氏实验动物设备有限公司); E191 型 CO₂ 培养箱(美国 SIM 公司); BH-2 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 细胞培养板(无锡耐斯生物科技有限公司)。

1.2 试剂与细胞

DTX(批号 190318, 质量分数>99%), 北京怡禾生物技术有限公司; 胆固醇(批号 20220812085), 天津市博迪化工有限公司; 注射用大豆磷脂(PC-80, 批号 202209013), 上海太伟药业有限公司; PLGA(批号 2022101526)、PLA(批号 2022092503)、mPEG5000-PCL45000(批号 2022071508)、mPEG5000-PLGA28000(批号 2022071710)、mPEG5000-PCL15000(批号 2022070908)、mPEG2000-PCL15000(批号 2022071122)、mPEG5000-PCL10000(批号 2022072014), 济南岱罡生物技术有限公司; RPMI 1640 培养基(货号 39205), 北京索莱宝科技有限公司; 鼠源性乳腺癌 4T1 细胞株, 南京科佰生物科技有限公司; pH 7.4 磷酸盐缓冲盐(PBS, 批号 69151709), 郑州创生生物工程技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 DTX-PLip 的制备

通过查阅文献和前期预试验结果, 采用薄膜分散-水化法^[11]制备 DTX-PLip。称取 DTX、胆固醇、PC-80、mPEG-PCL 适量, 置于圆底烧瓶中, 加入 3 mL 氯仿和 2 mL 乙醚的有机溶剂, 37 °C, 旋转蒸发 1 h 后, 待有机溶剂蒸发完全, 形成一层致密的薄膜。加入 4 mL PBS, 45 °C, 水合 30 min。将水化液放入超声波细胞粉碎机中, 在冰浴条件下超声处理 2 min(200 W, 工作 3 s, 间歇 4 s, 循环 40 次), 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得 DTX-PLip。

2.2 空白脂质体的制备

按照“2.1”项下制备步骤, 不加 DTX, 即得空白脂质体。

2.3 DTX 脂质体(DTX-Lip)的制备

按照“2.1”项下制备步骤, 不加聚合物 mPEG-PCL, 其余操作相同, 即得 DTX-Lip。

2.4 DTX 含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 检测波长 229 nm; 流动相为甲醇-水(75:25); 体

积流量 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 20 μL。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取 DTX 对照品 1.26 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 超声溶解, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 取 DTX-PLip 0.5 mL 置于 5 mL 量瓶中, 加入甲醇超声溶解并定容至刻度。用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 吸取续滤液 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.4.4 线性关系考察 分别吸取 DTX 对照品溶液 40、80、160、320、640、1280、2560、4200 μL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 配制成质量浓度分别为 0.504、1.008、2.016、4.032、8.064、16.128、32.256、52.920 μg·mL⁻¹ 的溶液。按“2.4.1”项下色谱条件进样分析, 以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X)为横坐标绘制标准曲线, 拟合标准曲线方程: $Y = 23\,843\,X + 11\,733$, $R^2 = 0.999\,1$, 线性范围 0.504~52.920 μg·mL⁻¹。

2.4.5 专属性考察 分别称取“2.4.2”项下对照品溶液 0.5 mL、空白脂质体、DTX-PLip 制剂于 5 mL 量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 涡旋, 超声。5000 r·min⁻¹, 离心 30 min, 取上清液按“2.4.1”项下方法进样测定。空白脂质体在对照品出峰位置上无吸收, 对照品溶液和供试品溶液中色谱峰分离度良好(图 1), 表明该方法专属性强。

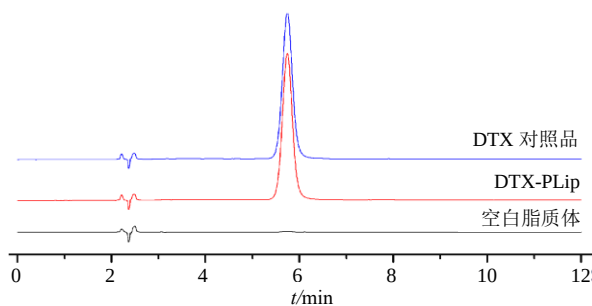


图 1 DTX 对照品、DTX-PLip、空白脂质体的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of DTX reference substance, DTX-Plip and blank liposome

2.4.6 精密度考察 精密称取 DTX 加甲醇配制成质量浓度分别为 0.504、8.064、52.92 μg·mL⁻¹ 的 DTX 溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 分别于 1 d 内取不同质量浓度的 DTX 溶液连续进样 5 次, 持续测定 5 d, 计算日内及日间 DTX 峰面积的相对标准偏差(RSD)。日内精密度 RSD 分别为 0.47%、

0.97%和 1.23%；日间精密度 RSD 分别为 0.98%、1.59%和 0.61%，表明仪器精密度良好。

2.4.7 重复性试验 取“2.1”项下供试品 6 份，按“2.4.3”项下的方法制备供试品溶液，按“2.4.1”项下色谱条件连续进样测定峰面积，RSD 为 1.07%，表明该方法重复性良好。

2.4.8 稳定性试验 按“2.4.3”项下的方法制备供试品溶液，分别在室温下于制备 0、2、4、6、8、10、12、24 h 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定。结果显示，供试品溶液峰面积的 RSD 为 0.59%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.9 加样回收率试验 精密吸取“2.2”项下空白脂质体 1 mL，分别加入适量 DTX 对照品溶液，用甲醇稀释成质量浓度为 0.504、8.064、52.92 μg·mL⁻¹，按“2.4.1”项下方法进样测定，计算药物浓度。DTX 的平均回收率为 97.31%，RSD 为 1.33%，表明该方法准确度高。

2.5 EE、LC、粒径及ζ电位的测定

采用超滤离心法^[12]进行 EE 测定。吸取 1 mL DTX-PLip 于超滤离心管中，转速为 4 000 r·min⁻¹，离心 30 min，取滤液，按“2.4.1”法测定并计算游离 DTX 的量；另吸取 1 mL DTX-PLip 到 5 mL 量瓶中，加适量甲醇溶解，涡旋 5 min，加甲醇定容至刻度，超声 10 min，破乳成功后，10 000 r·min⁻¹，离心 10 min，取上清液，按“2.4.1”法测定，计算脂质体中药物的量。取 0.2 mL DTX-PLip，加入超纯水稀释至 2 mL，置于激光纳米粒度分布仪，设置仪器温度为 25 ℃，测定粒径和ζ电位。每份样品测定 3 次，取平均值。

$$EE = (W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / W_{\text{总}}$$

$$LC = (W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / W$$

$W_{\text{游离}}$ 指游离 DTX 的量， $W_{\text{总}}$ 指脂质体中药物的量， W 指脂质体中药物和载体材料的总质量

2.6 单因素考察

2.6.1 聚合物种类的考察 固定 DTX 用量为 8 mg，药脂比 1：20，胆脂比 1：5，聚合物用量 50 mg，分别加入 50 mg 不同种类的聚合物材料溶于氯仿：乙醚=3：2 的混合溶剂中，按照“2.1”项下方法制备脂质体，以粒径、EE、LC 为评价指标，结果如表 1 所示，选择聚合物材料 mPEG5000-PCL10000 制备的 DTX-PLip 制剂，有较小的粒径且 EE 和 LC 最大，故本实验选择用两嵌段共聚物 mPEG5000-PCL10000 对脂质体进行修饰。

表 1 聚合物种类考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

聚合物种类	粒径/nm	EE/%	LC/%
PLGA	153.81±1.13	46.64±0.10	1.490±0.003
PLA	160.22±1.07	49.66±0.09	1.590±0.003
mPEG5000-PCL45000	84.53±2.01	63.92±0.09	2.050±0.002
mPEG5000-PLGA28000	150.21±1.42	67.83±0.13	2.170±0.004
mPEG5000-PCL10000	87.89±1.63	79.48±0.09	2.540±0.003
mPEG5000-PCL15000	204.42±0.35	71.38±0.64	2.280±0.021
mPEG2000-PCL15000	338.11±0.89	58.43±0.04	1.870±0.001

2.6.2 聚合物 mPEG5000-PCL10000 用量的考察 固定 DTX 用量 8 mg，药脂比 1：20，胆脂比 1：5，设定聚合物添加的质量分别为 50、100、150、200 mg，按照“2.1”项的方法制备脂质体，以粒径、EE、LC 为评价指标，结果见图 2。

随着聚合物质量的增加，粒径先减小后增加，EE 先增加后减小；聚合物用量的增加会使得脂质体中载体材料增加，使得 LC 减小，当聚合物用量为 150 mg 时，与聚合物添加量为 50 mg 相比，LC 降低不明显，仅降低了 0.14%，说明聚合物 mPEG5000-PCL10000 的加入增大了药物 EE，但当聚合物量继续增加到 200 mg，EE 呈现下降趋势，LC 下降明显，LC 下降了 0.4%；且当聚合物用量为 150 mg 时脂质体的粒径最小，EE 最大。故选择加入聚合物的质量为 150 mg 进行后续实验优化。

2.6.3 DTX 用量的考察 固定药脂比为 1：20，胆脂比为 1：5，mPEG5000-PCL10000 用量为 150 mg，调整 DTX 用量分别为 4、8、12、16 mg，按照“2.1”

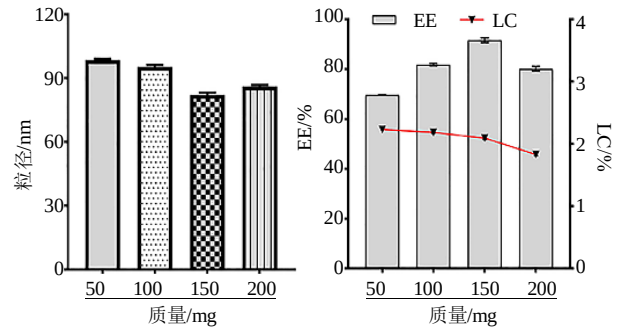


图 2 聚合物用量考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Investigation of polymer amounts ($\bar{x} \pm s, n=3$)

项的方法制备脂质体，以粒径、EE、LC 为评价指标，结果见图 3。

随着 DTX 药物用量的增加，脂质体的粒径逐渐增加，EE 先增加后减小，LC 先增加后基本保持不变；说明一定量的载体材料在制备脂质体时只能包封一定质量的药物，当脂质体中 DTX 药物质量增加到一定值时，载体材料不足以包封所添加的药物，会出现药物的泄露，致使制剂的 EE 和 LC 下降；当 DTX 用量为 8 mg 时，EE、LC 最大，粒径较小。故选择 DTX 用量为 8 mg 进行后续实验优化。

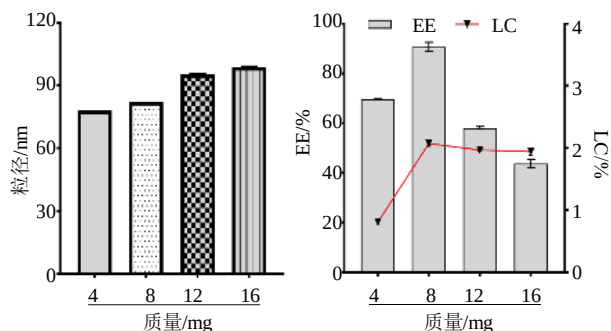


图 3 DTX 用量考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Investigation of DTX amounts ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.6.4 药脂比的考察 固定 mPEG5000-PCL10000 用量为 150 mg，DTX 用量为 8 mg，胆脂比为 1:5，调整药脂比 1:15、1:20、1:25，按照“2.1”项的方法制备脂质体，以粒径、EE、LC 为评价指标，结果见图 4，随着磷脂加入量的增加，粒径先减小后增加，EE 和 LC 先增加后减少。当药脂比为 1:20 时，粒径最小，EE 和 LC 最大。故选择药脂比为 1:20 进行后续实验优化。

2.6.5 胆脂比的考察 固定 DTX 用量为 8 mg，药脂比为 1:20，mPEG5000-PCL10000 用量为 150 mg，

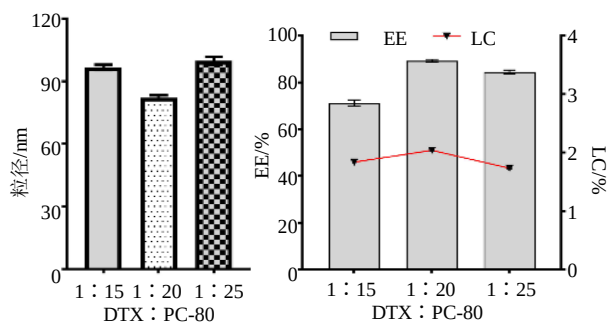


图 4 药脂比考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Investigation of drug-lipid ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

调整胆脂比分别为 1:3、1:4、1:5、1:6，按照“2.1”项的方法制备脂质体，以粒径、EE、LC 为评价指标，结果见图 5，随着胆脂比的增加，粒径先减小后增加，EE 和 LC 先增加后减小，当胆脂比为 1:5 时，脂质体的粒径最小，EE 和 LC 最大。故选择胆脂比为 1:5 进行后续实验优化。

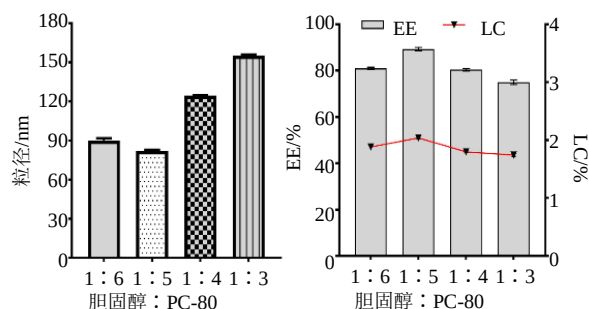


图 5 胆脂比考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Investigation of cholesterol-lipid ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.7 正交试验优化 DTX-PLip 的处方工艺

综合上述单因素考察实验结果，发现 DTX 用量、mPEG5000-PCL10000 用量、药脂比、胆脂比影响较大，故选择 DTX 用量(A)、胆脂比(B)、药脂比(C)、聚合物 mPEG5000-PCL10000 的用量(D)作为主要影响因素，以粒径、EE 和 LC 参照下列综合评分公式拟合的综合评分^[8]为指标，进行 4 因素 3 水平的正交实验，优选 DTX-PLip 的处方工艺。

综合评分 = 粒径最小值/粒径 $\times 50$ + LC/LC 最大值 $\times 25$ + EE/EE 最大值 $\times 25$

正交实验因素设计及结果见表 2，方差结果见表 3。极差(R)的大小代表着影响脂质体粒径、EE、LC 的不同因素之间的主次顺序，R 越大的因素往往主要性越明显，根据极差结果显示，4 个因素中影响程度的大小为： $A > C > D > B$ ，均值 k 的大小说明一个因素下不同水平对 EE 影响的优先顺序，即最优处方为 $A_2B_2C_2D_3$ ，即 DTX 质量为 8 mg，药脂比为 1:20，胆脂比为 1:5，聚合物 mPEG5000-PCL10000 的加入量为 150 mg。

2.8 最佳工艺验证

按最佳处方和制备工艺制备 DTX-PLip，进行 3 批次重复实验，DTX 的 EE 与 LC 分别为 $(89.34 \pm 1.07)\%$ 、 $(2.04 \pm 0.02)\%$ ，综合评分为 (90.35 ± 2.56) ，RSD 为 0.97%，结果表明该方法重复性良好。

表 2 正交实验设计及结果
Table 2 Orthogonal design and results

序号	A/mg	B	C	D/mg	粒径/nm	EE/%	LC/%	综合评分
1	4(1)	1 : 4(1)	1 : 15(1)	50(1)	117.80	70.40	1.38	65.01
2	4	1 : 5(2)	1 : 20(2)	100(2)	98.28	79.50	1.07	72.72
3	4	1 : 6(3)	1 : 25(3)	150(3)	104.25	81.20	0.84	69.08
4	8(2)	1 : 4	1 : 20	150	84.56	89.30	2.00	88.51
5	8	1 : 5	1 : 25	100	87.92	82.40	1.90	83.90
6	8	1 : 6	1 : 15	50	135.24	78.20	3.16	74.37
7	12(3)	1 : 4	1 : 25	100	123.15	74.90	2.48	72.05
8	12	1 : 5	1 : 15	150	141.54	80.10	3.14	73.47
9	12	1 : 6	1 : 20	50	154.08	76.70	3.70	73.67
K ₁	206.80	225.56	212.84	213.04				
K ₂	246.77	230.09	234.90	228.66				
K ₃	219.19	217.12	225.02	231.05				
k ₁	68.93	75.19	70.95	71.01				
k ₂	82.26	76.70	78.30	76.22				
k ₃	73.06	72.37	75.01	77.02				
R	13.33	4.33	7.35	6.01				

表 3 方差分析结果
Table 3 Variance analysis results

误差来源	偏差平方和	自由度	均方值	F 值	显著性
A	837.024	2	418.512	2313.83	$P<0.01$
B	42.021	2	21.010	116.160	$P<0.01$
C	206.455	2	103.227	570.714	$P<0.01$
D	75.254	2	37.627	208.030	$P<0.01$
误差	3.256	18	0.181		

2.9 储存稳定性考察

将 DTX-PLip 于 4 ℃冰箱中保存 21 d, 每隔 7 天检测该脂质体的粒径、EE 和 LC。表 4 结果显示, 粒径、EE、LC 没有发生明显变化, 表明 DTX-PLip 在 4 ℃环境中储存 21 d 内, 稳定性良好。

2.10 脂质体的表征

2.10.1 透射电镜 (TEM) 观察 取适量 DTX-PLip 用超纯水稀释 110 倍后, 将 10 μL 稀释后的 DTX-

PLip 滴加到 200 目的铜网上, 静置 5 min, 用 2.0% 磷钨酸负染 3 min, 得到工作样品, 空气干燥后, 放大 40 000 倍采用 TEM 观察 DTX-PLip 聚集形态, 结果如图 6 所示, DTX-PLip 是一种双分子层结构形的封闭囊泡结构, 粒径约为 100 nm。

2.10.2 粒径、ζ电位的测定 按照最佳工艺新制备 3 批 DTX-PLip, 按“2.5”项下方法测定粒径和ζ电位。结果见图 7。DTX-PLip 的平均粒径为 (82.13 ± 3.33) nm, ζ电位为 (-15.70 ± 3.86) mV, DTX-PLip 分散均匀, 稳定性较好。

2.11 DTX-PLip 的体外释放研究

采用透析袋法^[13] (截留相对分子质量 8 000~

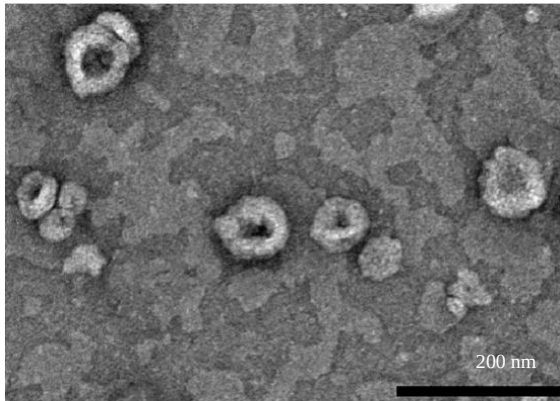


图 6 DTX-PLip 的透射电镜图
Fig. 6 TEM image of DTX-Plip

表 4 储存稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 4 Storage stability of DTX-PLip ($\bar{x} \pm s, n=3$)

存储时间/d	平均粒径/nm	EE/%	LC/%
0	80.25±3.13	90.96±0.49	2.08±0.01
7	81.13±2.36	89.34±1.37	2.04±0.33
14	79.47±3.21	87.29±1.02	2.00±0.02
21	83.37±3.72	85.15±1.11	1.95±0.03

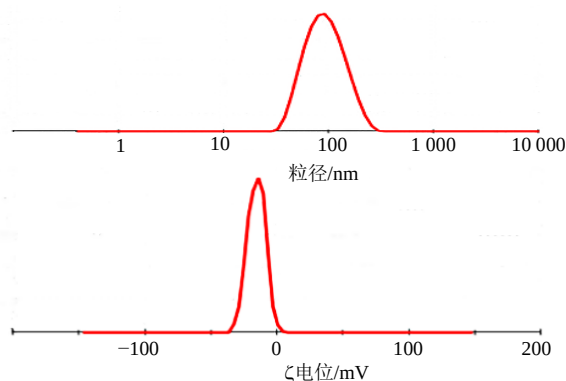


图 7 DTX-PLip 的粒径及 ζ 电位图

Fig. 7 Particle size and ζ potential of DTX-PLip

14 000), 精密量取 DTX 溶液、DTX-Lip、DTX-PLip 各 200 μ L, 置于预处理过的透析袋中, 两头扎紧后置于 30 mL 的含 0.5% 聚山梨酯 80 的 PBS 溶液中, 置于恒温气浴振荡器 (温度 37 $^{\circ}$ C, 转速 75 $r \cdot min^{-1}$)。分别于 1、2、4、6、8、10、12、24、30、48、56、70、80 h 吸取 2 mL, 同时补加同样体积的释放介质。将 2 mL 待测液以 10 000 $r \cdot min^{-1}$, 离心 10 min, 吸取上清液按“2.4.1”项下方法测定 DTX 质量浓度, 并计算药物累积释放率。以时间为横坐标, 药物的累积释放率为纵坐标, 绘制体外释放曲线, 结果见图 8。游离 DTX 在 12 h 内药物释放达到 100%, DTX-Lip 在 72 h 药物的累积释放率为 84%, 而 DTX-PLip 在 72 h 药物的累积释放率为 58%。表明将 DTX 制备成聚合物脂质体具有很好的缓释效果。

将 DTX、DTX-Lip、DTX-PLip 释放数据按零级、一级、Higuchi、Ritger-Peppas 方程拟合, 以拟

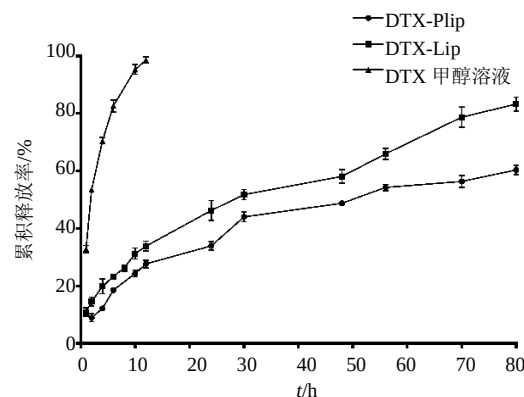


图 8 体外释放曲线

Fig. 8 *In vitro* release curve

合相关系数 (r) 最大为最佳结果, 结果见表 5, DTX 甲醇溶液释放曲线符合一级动力学模型, 可反映药物在介质中的释放速率, 有助于预测 DTX 在体内的实际释放速率; DTX-Lip 的释放曲线符合 Ritger-Peppas 动力学释药模型, 说明 DTX-Lip 中 DTX 不是简单的扩散过程, 而是扩散和溶蚀协同作用; DTX-PLip 的释放曲线符合 Higuchi 动力学释药模型, 表明 DTX 从 DTX-PLip 中的释放主要是通过扩散机制进行的。

2.12 DTX-PLip 体外抗肿瘤活性评价

2.12.1 细胞毒性试验 采用 MTT 法^[14], 取处于对数期生长的 4T1 细胞株, 以每孔 6×10^3 个的细胞密度种植到 96 孔板中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 弃去细胞培养液。分别加入 200 μ L 不同质量浓度的 DTX、DTX-Lip、DTX-Plip (0.011、0.055、0.220、2.200、2.000 $\mu g \cdot mL^{-1}$), 以正常培养基为对照组, 空白组不接种细胞, 每个质量浓度设置 6

表 5 体外释放模型拟合结果

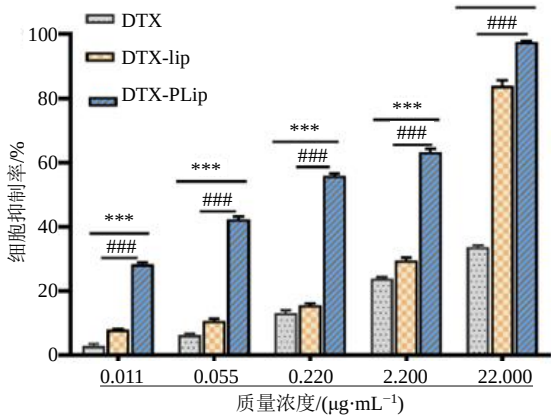
Table 5 Fitting results of *in vitro* release model

样本	模型	方程	r
DTX 甲醇溶液	零级释放	$Q=5.420\ 3\ t+40.603$	0.938 6
	一级释放	$\ln(100-Q)=0.329\ 7\ t+4.627\ 3$	0.990 3
	Higuchi	$Q=25.751\ t^{1/2}+14.325$	0.979 1
	Ritger-Peppas	$\ln Q=0.428\ 6\ \ln t+3.596\ 5$	0.982 4
DTX-Lip	零级释放	$Q=0.858\ t+18.7$	0.979 9
	一级释放	$\ln(100-Q)=4.471\ 6-0.019\ 2\ t$	0.988 5
	Higuchi	$Q=8.848\ 4\ t^{1/2}+2.104\ 5$	0.996 4
	Ritger-Peppas	$\ln Q=0.460\ 9\ \ln t+2.359\ 1$	0.998 2
DTX-PLip	零级释放	$Q=0.626\ 4\ t+15.952$	0.956 3
	一级释放	$\ln(100-Q)=4.449\ 9-0.0103\ t$	0.979 5
	Higuchi	$Q=6.832\ 8\ t^{1/2}+1.517\ 8$	0.990 8
	Ritger-Peppas	$\ln Q=0.515\ 2\ \ln t+1.917\ 6$	0.990 7

个平行孔，于细胞培养箱中培养 24 h 后，弃去旧培养基，加入 100 μL MTT 溶液，放在培养箱孵育 4 h 后吸出，每孔加入 DMSO 溶液 150 μL ，混悬 10 min。采用酶标仪在波长为 490 nm 下检测各组的吸光度 (A) 值。计算各组细胞生长抑制率，应用 SPSS19.0 软件计算各组的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。

细胞生长抑制率 = $1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$

实验结果如图 9 所示。DTX、DTX-Lip 和 DTX-PLip 对 4T1 细胞的增殖均有一定的抑制作用，且具有浓度相关性；与 DTX 组和 DTX-Lip 组相比，DTX-PLip 组对 4T1 细胞的抑制作用显著提高 ($P < 0.001$)。DTX-Plip、DTX-Lip、DTX 的 IC_{50} 分别为 (0.13 ± 0.01) 、 (3.48 ± 0.28) 、 $(116.70 \pm 4.63) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，与其他两组比较，DTX-PLip IC_{50} 存在显著性差异 ($P < 0.001$)，这可能是由于 PLip 作为 DTX 的载体促进了 4T1 细胞对 DTX 的摄取，从而增加了 DTX 在 4T1 细胞中的富集量，增强了药物的抗肿瘤细胞生长作用。



与 DTX 组比较: *** $P < 0.001$; 与 DTX-Lip 组比较: ### $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs DTX DMSO group; ### $P < 0.001$ vs DTX-Lip group

图 9 DTX、DTX-Lip 和 DTX-PLip 对 4T1 细胞的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Inhibitory effects of DTX, DTX-Lip and DTX-PLip on 4T1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.12.2 荧光显微镜观察细胞摄取情况 采用薄膜分散法^[15]将香豆素 6 (C6) 包载入脂质体中，制备 DTX-C6-Lip 及 DTX-C6-PLip。取对数期 4T1 细胞用胰酶消化后，将细胞以 2.5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔板内，每孔加入 2 L 的细胞混悬液培养 24 h 使其贴壁。24 h 后吸去旧培养基，向孔中加入提前用培养基稀释的 DTX-C6-Lip 及 DTX-C6-PLip (C6 质量浓度为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，继续培养，分别在相应的

时间点 (1、2、4、6 h) 将培养基弃掉，用 PBS 冲洗 2 遍。于荧光倒置显微镜下观测情况，结果见图 10，采用 Image J 软件进行平均荧光强度半定量分析，结果见表 6，随着作用时间的增加，DTX-PLip 与 DTX-Lip 的荧光强度均有所增加。与 DTX-Lip 相比，DTX-PLip 在各个时间平均荧光强度均显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001)，说明药物包载于 DTX-PLip 后，可促进药物载体与细胞融合。

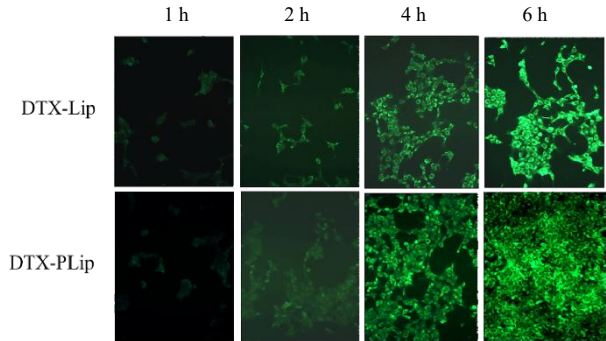


图 10 不同时间点 4T1 细胞与脂质体的融合情况
Fig.10 Fusion of 4T1 cells with liposomes at different time

表 6 不同时间点的细胞摄取荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 6 Fluorescence intensity of cell uptake at different time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	荧光强度/AU			
	1 h	2 h	4 h	6 h
DTX-	31.78 $\pm$	40.66 $\pm$	51.50 $\pm$	51.94 $\pm$
Lip	2.59	0.95	1.17	0.84
DTX-	37.11 $\pm$	48.01 $\pm$	57.73 $\pm$	70.40 $\pm$
PLip	1.15**	1.51***	2.10***	0.85***

与 DTX-Lip 比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs DTX-Lip group.

2.12.3 流式细胞仪检测细胞摄取情况

取生长状态良好的对数期 4T1 细胞用胰酶消化后，将细胞以 2.5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔板内，每孔加入 2 mL 的细胞混悬液，培养 24 h 使细胞贴壁。24 h 后吸去旧培养基，以 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 C6 溶液为对照组，实验组每孔中分别加入用培养基稀释的 DTX-C6-Lip 及 DTX-C6-PLip (C6 质量浓度为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，继续孵育，分别于相应的时间点 (1、2、4、6 h) 弃掉培养基，用 PBS 冲洗 2 遍。胰酶消化后用新鲜的培养基混悬细胞，调细胞浓度 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ，然后将细胞悬浮液过 200 目筛，混合均匀后于避光条件下放于流式细胞仪中进行定量测定，各组脂质体跨越细胞能力

的流式摄取曲线结果如图 11 所示。使用 FlowJo 软件统计各组摄取量, 计算摄取率^[16], 结果如表 7 所示。

细胞摄取率=荧光细胞数量/细胞总数量

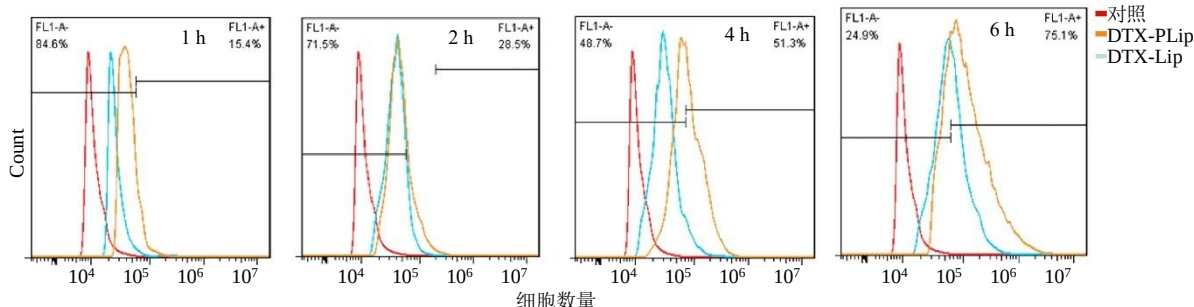


图 11 4T1 细胞的定量摄取图
Fig. 11 Quantitative uptake map of 4T1 cells

表 7 脂质体对 4T1 细胞的定量摄取结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 7 Quantitative uptake results of liposomes by 4T1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/h	DTX-Lip 摄取率/%	DTX-PLip 摄取率/%
1	12.20±0.04	15.40±0.07***
2	18.30±0.07	28.50±0.05***
4	29.20±0.11	51.30±0.08***
6	40.50±0.09	75.10±0.13***

与 DTX-Lip 比较: *** $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs DTX-Lip group.

3 讨论

DTX 是一种紫杉烷类抗肿瘤药物, 是乳腺癌治疗的基石药物, 但因其水溶性差, 稳定性欠佳及耐药性等问题, 严重制约了临床应用的广度与深度^[17]。脂质体作为由磷脂双分子层构成的纳米级囊泡载体, 凭借将细胞毒性药物精准递送至靶细胞的独特优势, 已成为肿瘤靶向治疗领域的重要工具。但传统脂质体存在靶向特异性不足、药物突释严重等缺陷, 限制了其治疗效果^[18]。本研究采用两亲性聚合物材料 mPEG5000-PCL10000 对脂质体进行表面修饰, 利用单因素结合正交实验优化 DTX-PLip 处方, 提高脂质体的 EE 和稳定性, 并通过细胞毒及细胞摄取实验评估其体外抗肿瘤活性。

mPEG5000-PCL10000 作为一种两亲性聚合物, 凭借独特的亲水-疏水嵌段结构, 可在脂质体的脂质双分子层表面形成刷状外层。该外层通过空间位阻效应显著增强脂质体粒子间的静电斥力, 不仅有效抑制脂质体的黏附和聚集, 还能抵御胃肠环境

与 DTX-Lip 相比, DTX-PLip 能够被更多的细胞所摄取, 结果与荧光显微镜观察的结果一致。因此, 聚合物修饰的脂质体可以提高细胞的摄取, 以此来增强制剂的抗肿瘤作用。

中酶的降解作用, 同时保障脂质体在存储过程中的结构完整性, 从而提高脂质体的稳定性^[19]。本研究采用 mPEG5000-PCL10000 对脂质体进行修饰, 利用薄膜分散-水化法制备得到 DTX-PLip, 其平均粒径为 (82.13 ± 3.33) nm, 小于 100 nm, 使其能够通过肿瘤组织特有的 EPR, 顺利穿过肿瘤部位的毛细血管壁实现靶向递送。DTX-PLip 的 EE 可达 89.34%, 相较于普通脂质体有显著提升。稳定性测试结果显示, 普通脂质体在 (4 ± 2) °C 条件下放置 7 d 后底部有白色沉淀, 稳定性变差, 而 DTX-PLip 在 (4 ± 2) °C 条件下, 放置 21 d, 粒径和 EE 没有发生明显的变化, 展现出良好的长期储存稳定性。

普通脂质体进入体循环后, 易被 RES 吞噬, 采用 mPEG5000-PCL10000 修饰后的脂质体, 能有效避免与体内内源性成分结合, 显著降低 RES 的吞噬效率, 进而实现制剂缓释性能的提升^[20]; 同时, mPEG5000-PCL10000 的疏水 PCL 片段可以嵌入脂质体核心, 延长药物的释放时间。细胞毒实验结果表明, DTX-PLip 对 4T1 细胞的细胞毒作用最强, 说明将聚合物脂质体作为 DTX 的载体, 使得脂质体释放时间明显延长, DTX 的细胞毒作用显著增强; 细胞摄取实验表明相较于 DTX-Lip, DTX-PLip 的细胞内吞效率得到大幅提升。本研究成功构建了 mPEG5000-PCL10000 修饰的脂质体递药系统, 所制备的 DTX-PLip 具备粒径均一可控、EE 高、物理稳定性好等特点, 且具有良好的缓释特性与显著增强的抗肿瘤活性。然而, 本研究目前只考察了制剂的体外抗肿瘤作用, 鉴于体内的环境比较复杂如

RES 吞噬、血液蛋白结合、血流动力学等生理屏障的影响,脂质体在体循环中对肿瘤细胞的靶向性及药效仍需进一步研究。因此,后续需通过动物模型系统研究 DTX-PLip 体内靶向分布特性,深入探究其药动学及药效学规律,全面评估该纳米递药系统的临床转化潜力。综上,本研究制备的 DTX-PLip 为乳腺癌的靶向治疗提供了一个极具潜力的纳米递送策略,有望实现高效低毒的精准治疗目标,为后续临床研究奠定理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024, 74(3):229-263
- [2] Zhu Y, Luo S Y, Chen Y J, et al. Preparation and studies of docetaxel proliposome [J]. *Mat Express*, 2019, 9(7): 831-838.
- [3] 张蕾, 薛永飞, 冀叶, 等. 氨磷汀联合多西他赛和卡铂治疗卵巢癌的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(3): 621-624.
Zhang L, Xue Y F, Ji Y, et al. Clinical study on amifostine combined with docetaxel and carboplatin in treatment of ovarian cancer [J]. *Drugs Clinic*, 2018, 33(3): 621-624.
- [4] Cai J, Qian K Y, Zuo X L, et al. PLGA nanoparticle-based docetaxel/LY294002 drug delivery system enhances antitumor activities against gastric cancer [J]. *J Biomater Appl*, 2019, 33(10): 1394-1406.
- [5] 董美阳, 许卉, 施亚琴, 等. 多西他赛注射液血液平衡透析研究 [J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(4): 636-643.
Dong M Y, Xu H, Shi Y Q, et al. Study on equilibrium dialysis of docetaxel injection in blood [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(4): 636-643.
- [6] 谷文睿, 杨雅, 马欢, 等. 脂质体药物递送系统研究进展及临床应用 [J]. *中国药房*, 2023, 34(4): 508-512.
Gu W R, Yang Y, Ma H, et al. Research progress and clinical application of liposomal drug delivery system [J]. *China Pharm*, 2023, 34(4): 508-512.
- [7] Rao S V, Kumar S S. mPEG-PCL nanoparticles as new carriers for delivery of a prostate cancer drug flutamide [J]. *Res J Pharm Technol*, 2021: 3657-3661.
- [8] 王锋, 张超, 郑栓. 具有线粒体靶向性的雷公藤甲素 TPP-PEG-PCL 脂质体的制备及其促肝肿瘤细胞凋亡研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(24): 7473-7483.
Wang F, Zhang C, Zheng S. Preparation of triptolide TPP-PEG-PCL liposomes with mitochondrial targeting and its promotion apoptosis of hepatic tumor cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(24): 7473-7483.
- [9] Xing Y B, Liu X, Li X, et al. PEG-PCL modification and intestinal sustained-release of solid lipid nanoparticles for improving oral bioavailability of 2-methoxyestradiol [J]. *J Liposome Res*, 2019, 29(3): 207-214.
- [10] Liu X, Li J C, Huang L, et al. Preparation and evaluation of MPEG-PCL polymeric nanoparticles against gastric cancer [J]. *J Wuhan Univ Technol Mater Sci Ed*, 2020, 35(6): 1162-1168.
- [11] 谷丽艳, 孙朝渭, 刘鑫程, 等. HAIYPRH 修饰鬼臼毒素脂质体处方工艺优化及其靶向性评价 [J]. *中草药*, 2024, 55(24):8392-8402.
Gu L Y, Sun C W, Liu X C, et al. Optimization of formulation process of HAIYPRH modified podophyllotoxin liposomes and evaluation of brain targeting [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(24): 8392-8402.
- [12] 张艺, 杭太俊, 宋敏. 载药脂质体包封率测定方法的研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2021, 52(2): 245-252.
Zhang Y, Hang T J, Song M. Progress in research on the determination of entrapment efficiency of liposomes [J]. *J China Pharm Univ*, 2021, 52(2): 245-252.
- [13] 张颖, 许霞青, 何勐, 等. 光敏性多西他赛脂质体的研究与抗肿瘤作用评价 [J]. *中国医药工业杂志*, 2022, 53(3): 335-344.
Zhang Y, Xu X Q, He M, et al. Study and antitumor evaluation of photosensitive docetaxel liposomes [J]. *Chin J Pharm*, 2022, 53(3): 335-344.
- [14] 季珂, 韩华, 韩冰, 等. 转铁蛋白修饰的姜黄素脂质体的制备及体外抗肿瘤活性 [J]. *中草药*, 2022, 53(18): 5649-5656.
Ji K, Han H, Han B, et al. Preparation and anti-tumor activity *in vitro* of transferrin modified curcumin liposomes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(18): 5649-5656.
- [15] 孔昱欢, 张晓萍, 施经斌, 等. 载雷公藤红素的人参皂苷 Rg₃ 脂质体制备及其靶向治疗三阴性乳腺癌实验研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(13): 4327-4337.
Kong Y H, Zhang X P, Shi J B, et al. Preparation of ginsenoside Rg₃ liposomes loaded with celastrol and its targeted therapy for triple-negative breast cancer [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(13): 4327-4337.
- [16] Bishop C J, Majewski R L, Guiriba T M, et al. Quantification of cellular and nuclear uptake rates of polymeric gene delivery nanoparticles and DNA plasmids via flow cytometry [J]. *Acta Biomater*, 2016, 37: 120-130.

- [17] Wang L, Guo Z R, Zhang S, et al. The safety of neoadjuvant therapy with polyethylene glycol liposome adriamycin combined with docetaxel in patients with breast cancer complicated by axillary lymph node metastasis [J]. *Altern Ther Health Med*, 2023, 29(4):177-183.
- [18] Kogkos G, Gkartziou F, Mourtas S, et al. Liposomal entrapment or chemical modification of Relaxin2 for prolongation of its stability and biological activity [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(10):1362.
- [19] Singh K, Biharee A, Vyas A, et al. Recent advancement of polymersomes as drug delivery carrier [J]. *Curr Pharm Des*, 2022, 28(20): 1621-1631.
- [20] 邓朗, 张玉, 张奕聪, 等. 细胞膜融合的 PEG 修饰脂质体的制备及其体外性质 [J]. *华西药学杂志*, 2021, 36(6): 621-624.
- Deng L, Zhang Y, Zhang Y C, et al. Preparation and *in vitro* characterizations of cell-membrane-fused PEGylated liposomes [J]. *West China J Pharm Sci*, 2021, 36(6): 621-624.

[责任编辑 孙英杰]