

药载比对和厚朴酚-分枝状聚乙二醇聚合物 G2 纳米粒形态及体外抗肿瘤活性的影响

邱瀚弘^{1,2}, 朱志军¹, 张雪洁^{2,3}, 王向涛^{1,2}, 韩美华², 郭一飞^{2*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

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

3. 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

摘要: 目的 采用分支状聚乙二醇化聚合物 G2 制备不同药载比的和厚朴酚 (HK) 纳米粒, 考察其稳定性、体外释放及细胞毒等体外表征, 以期丰富现有的纳米载药系统并筛选合适的药载比。方法 采用超声-蒸发法将有机相 (HK 和 G2 的丙酮溶液的混合相) 缓慢注入到去离子水中, 减压旋蒸除去有机溶剂即得 HK-G2 纳米粒 (HK-G2-Nps), 分别制备药载比为 1:1、2:1、4:1、8:1 的纳米粒。利用马尔文粒度分析仪测定 HK-G2-Nps 粒径、Zeta 电位及聚合物分散性指数 (PDI) 值; 高效液相色谱 (HPLC) 法测定各药载比载药量; 用扫描电镜观察其形态; 动态膜透析法进行体外释药试验; 以乳腺癌 4T1 细胞为模型用 MTT 法评价质量浓度为 50.0、10.0、5.0、2.5、1.0、0.5、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的各药载比 HK-G2-Nps 细胞毒作用。结果 各药载比 HK-G2-Nps 的粒径分布较为集中, 分散较为均匀; 载体 G2 的用量影响 HK-G2-Nps 的粒径大小, 随着药载比的增加, 粒径逐渐减小, 载药量提高。稳定性结果显示, 纳米粒室温下放置稳定; 纳米粒在 0.9%NaCl 中粒径明显增大, 在 5% 葡萄糖溶液、PBS 缓冲液和血浆中可稳定存在。电镜结果显示, 药载比为 1:1 时, 纳米粒没有均一的形态; 药载比为 2:1 时, 纳米粒呈现出不规则的类球状; 药载比为 4:1 时, 呈现出规则均一的球形; 药载比达到 8:1 时, 纳米粒呈现出明显的立方柱状形态同时存在不规则球状。体外释放试验结果显示, 在前 24 h, 纳米粒能够迅速释放, 药载比为 4:1 时累计释放最高, 可达 70% 左右; 24 h 之后, 4 个药载比均缓慢释放至 120 h, 药载比 1:1 和 2:1 的累计释放率均在 60% 左右, 药载比 4:1 和 8:1 的累计释放率可达 80%、89%。HK-G2-Nps 各药载比 4T1 细胞增殖抑制率均大于游离组 HK, 药载比为 4:1 时作用最显著, 其中质量浓度 50.0、10.0、2.5、1.0、0.5、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 显著高于 HK 组 ($P < 0.05$), 半数抑制浓度 (IC_{50}) 值为 3.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结论 成功筛选并制备药载比为 4:1 的 HK-G2-Nps, 其对乳腺癌 4T1 细胞增殖抑制率大于 HK。

关键词: 和厚朴酚; 纳米粒; 抗肿瘤; 分枝状聚乙二醇化聚合物; 形态; 粒径; 细胞毒

中图分类号: R962 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 11-1951-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.11.004

Effect of drug loading ratio on honokiol - branched polyethylene glycol polymer G2 nanoparticles morphology and *in vitro* antitumor activity

QIU Hanhong^{1,2}, ZHU Zhijun¹, ZHANG Xuejie^{2,3}, WANG Xiangtao^{1,2}, HAN Meihua², GUO Yifei²

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046 China

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

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

Abstract: Objective To prepare honokiol (HK) nanoparticles with different drug loading ratios, using the branching oligoethylene glycols (OEG) dendron (G2) the *in vitro* characterizations of nanoparticles such as stability, *in vitro* release properties, and cytotoxicity were investigated in order to filter the appropriate drug loading ratio for further *in vitro* studies. **Method** The ultrasonic-evaporation method was used to inject the organic phase (mixture phase of HK and G2 acetone solution) into deionized water slowly and spin down to remove the organic solvent under reduced pressure, HK-G2 nanoparticles (HK-G2-Nps) with drug loading ratios of

收稿日期: 2018-05-16

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助(2017-I2M-1-013)

第一作者: 邱瀚弘(1994—), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 主要从事药物新剂型研究。Tel: 18810628633 E-mail: hhqiu163@163.com

*通信作者: 郭一飞(1982—), 女, 河南郑州人, 副研究员, 博士, 主要从事药物新型传递系统研究。Tel: 57833264 E-mail: ffguo@163.com

1: 1, 2: 1, 4: 1 and 8: 1 were prepared respectively. The particle size Zeta potential and polymer dispersion index (PDI) of HK nanoparticles was determined using a Malvern particle size analyzer, the specific drug loading was determined by HPLC, the morphology of HK nanoparticles was observed by scanning electron microscopy, the drug release test *in vitro* was performed by dynamic membrane dialysis, and the cytotoxicity of HK nanoparticles of 50.0, 10.0, 5.0, 2.5, 1.0, 0.5 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was evaluated by MTT assay using 4T1 cell line. **Results** The particle size distribution of each drug-loading ratio HK-G2-Nps was concentrated and uniform; The amount of carrier G2 affects the particle size of HK-G2-Nps; With the increase of drug-loading ratio, the particle size decreases gradually, and the drug loading increases. The stability results showed that the nanoparticles were stable at room temperature, and the particle size increased significantly in 0.9% NaCl. The nanoparticles were stable in 5% glucose solution, PBS buffer and plasma. The results of electron microscopy showed that when the drug loading ratio was 1:1, the nanoparticles had no uniform morphology; When the drug loading ratio was 2: 1, the nanoparticles showed irregular spherical shape; When the drug loading ratio was 4: 1, the nanoparticles showed regular spherical shape; When the drug loading ratio was 8: 1, the nanoparticles showed obvious cubic columnar shape and irregular spherical shape. The results of *in vitro* release test showed that the nanoparticles could be released rapidly in the first 24 hours, and the cumulative release rate was about 70% when the drug-loading ratio was 4: 1. After 24 h, the four drug-loading ratios were released slowly to 120 h, the cumulative release rates of drug-loading ratio 1:1 and 2:1 were about 60%, and the cumulative release rates of drug-loading ratio 4: 1 and 8: 1 were 80% and 89%. The inhibitory rate of proliferation of HK-G2-Nps 4T1 cells was higher than that of free HK cells. The inhibitory rate of drug-loading ratio 4: 1 at concentration of 50.0, 10.0, 2.5, 1.0, 0.5 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was significantly higher than that of HK ($P < 0.01$), and the half inhibitory concentration (IC_{50}) was 3.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **Conclusion** The preparation and screening of HK nanoparticles with a drug-loading ratio of 4: 1 is needed for further study.

Key words: honokiol; nanoparticles; antitumor; branched PEGylated polymer; pattern; particle size; cytotoxicity

和厚朴酚(honokiol, HK)作为厚朴中最主要的两个活性成分之一,具有多种生物活性,已经被多次报道具有抗癌抗肿瘤作用^[1]。但其作为疏水性药物同时具有酚羟基结构(图1),导致其水溶性差且易被氧化^[2],使HK在抗肿瘤领域的应用深受限制。为了克服这一难题,多位学者进行了研究,并尝试将HK制备成纳米混悬剂^[3]、纳米乳^[4]、脂质体^[5]、胶束^[6]、纳米海绵^[7]等,均取得明显的改善,为HK走向临床应用创造了条件。

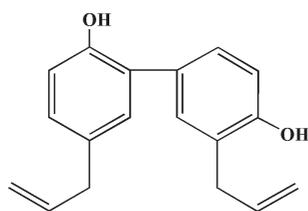


图1 HK结构式
Fig. 1 Structure of HK

文献报道纳米制剂多是用线性乙二醇类修饰的聚合物载体负载的^[8-13],但仅有的纳米载药系统是远远不能满足临床需求的。相比于线性PEG链段修饰,分枝状PEG为蛋白质上的PEG化位点增加了多个PEG链段而具备明显优势^[14],分枝状PEG修饰后蛋白质由于电泳行为的差异从而对肾小球滤过^[15]产生影响,以达到延长循环半衰期的目的^[16]。同时有研究表明,分枝状PEG拥有较线性PEG更大

的空间位阻,可显著增加酸碱度和温度敏感性,同时可躲避代谢酶的识别,降低代谢^[17]。

为了进一步丰富纳米载药系统,特尝试采用一种新型的分支状^[18-19]聚合物G2(结构如图2所示)来制备HK纳米粒。作为亲水性的二代三乙二醇树枝化^[20]基元寡聚乙二醇(OEG),G2将PEG链和支链^[21]结构的优点结合,可以有效的延长体循环时间^[22],改善溶解度,并且能够有效躲避网状内皮系统的捕捉^[23-24],同时能够有效提高纳米粒的载药量,为HK的临床应用提供了可能。

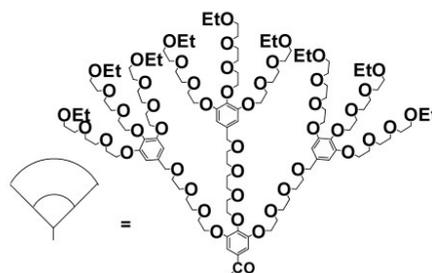


图2 G2结构式
Fig. 2 Structure of G2

1 材料

1.1 仪器

Meppler Toledo 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);PURELAB Classic 综合纯水仪(英国ELGA公司);KM-200DE型中文液晶超声波清洗器(昆山美美超声仪器有限公司);SHB-III循环水式

多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);RE-52CS型旋转蒸发器(上海振捷实验设备有限公司);HWSY11-K2电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表有限公司);Zetasizer-nanozs 90纳米粒度及Zeta电位分析仪(马尔文仪器有限公司);Ultimate3000 Series高效液相色谱仪(戴安中国有限公司);Eclipse Plus C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国);MCA-15AC细胞培养箱(日本Sanyo公司);Tecan M 1000多功能连续波长酶标仪(瑞士)。

1.2 细胞

4T1细胞(北京协和医学院基础所细胞中心)。

1.3 药品及主要试剂

HK(上海士峰生物科技有限公司,质量分数98.0%,批号17071322);胎牛血清、RPMI 1640培养基、青霉素和链霉素双抗(美国Gibco公司);96孔无菌培养板(美国Corning公司);3-(4, 5-二甲基噻唑-2)2, 5-二苯基四氮唑溴盐(噻唑蓝, MTT, 美国Sigma公司);乙腈(色谱纯, HiPure Chem公司);丙酮、乙醇等其他药品及试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法

2.1 HK含量测定方法的建立^[5]

2.1.1 高效液相(HPLC)色谱条件 Eclipse Plus C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);参考文献^[5]中方法,以0.2%甲酸水-乙腈(25:75)为流动相;检测波长为294 nm;体积流量为1 mL/min;柱温25℃;进样量20 μL。

2.1.2 标准曲线制备 精密称取HK,用乙腈溶解,定容后分别稀释制成质量浓度为0.01、0.10、1.00、2.50、5.00、10.00、25.00、50.00、100.00、200.00 μg/mL的对照品,在上述色谱条件下,HPLC法分析,用峰面积A对质量浓度C进行线性回归,求得回归方程。

2.2 HK-G2纳米粒(HK-G2-Nps)的制备及载药量测定

采用超声蒸发法制备HK纳米粒,将HK和G2^[6]按照质量比1:1分别溶于0.5 mL丙酮中,超声加速其溶解后二者混匀,制得有机相。在25℃、250 W的超声条件下,将有机相缓慢滴注到10 mL去离子水中,待有机相滴注完毕后,继续超声5 min,用旋转蒸发器减压旋蒸除去有机溶剂,即得HK-G2-Nps。

为考察不同药载比对HK-G2-Nps的影响,在同样制备条件下,制备药载比分别为2:1、4:1及8:1的HK-G2-Nps,并用马尔文粒度分析仪对其粒径、Zeta电位及聚合物分散性指数(PDI)值进行系列

考察。

取5 mL HK-G2-Nps混悬液在-80℃条件下预冻12 h,再用冻干机将其真空干燥24 h,即得HK-G2冻干粉末。精确称冻干后粉末质量,即为 W_2 ;后加入适量的乙腈溶液使药物从纳米粒中释放出来,采用HPLC法测定HK浓度,得纳米粒中HK质量 W_1 ,根据公式计算载药量(DL), $DL = W_1/W_2$ 。

2.3 HK-G2-Nps的放置稳定性及不同介质稳定性考察

将制备好的HK-G2-Nps放置于室温(25℃)下,观察是否有沉淀或浑浊出现,并监测0、1、3、5 d后的粒径分布。取HK-G2-Nps适量,分别与1.8%生理盐水、10%葡萄糖、PBS和血浆等体积混合,然后在37℃条件下孵育,分别在0、2、4、6 h时测定其粒径变化,观察纳米粒状态,并以不同时间点对粒径作图。

2.4 HK-G2-Nps的形态学考察

HK-G2-Nps的形态通过扫描电镜测定,取HK纳米粒20 μL,滴到硅片上,自然晾干,固定于铜柱上,真空、30 mA电流的条件下喷金240 s,扫描电镜下观察HK纳米粒的形态,加速电压30 mV。

2.5 HK-G2-Nps的体外释放考察

采用动态膜透析法进行体外释药试验。精密吸取2 mL释放样品(1 mg/mL,满足漏槽条件)装入经蒸馏水浸泡处理过的透析袋(切割相对分子质量为8 000~14 000)内,将袋口扎紧,加入50 mL PBS(含0.5% SDS),在37℃水浴恒温振荡器(100 r/min)内释放。在预设时间点(0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、12.00、24.00、48.00、72.00、96.00、120.00 h)取样1 mL,同时补加等温、等体积的释放介质。24 h后每24小时更换1次释放外液。样品采用HPLC法测浓度C,从而得出累计释放率,并绘制释放曲线。

2.6 HK-G2-Nps的体外细胞毒作用

将4T1细胞用RPMI完全培养基至对数期,以 1×10^5 /孔接种于96孔板,以内圈6×10个孔为实验观察对象,每孔加入150 μL完全培养基,外圈加入等量PBS;培养箱中培养24 h,弃去培养液,用不含FBS的培养基将HK-G2-Nps(1:1、2:1、4:1、8:1)和HK的DMSO溶液梯度稀释为50.0、10.0、5.0、2.5、1.0、0.5、0.1 μg/mL(按HK的质量浓度计算),每孔加入150 μL,对照组加入等量不含FBS的培养基。继续培养48 h后,每孔加入20 μL的MTT溶液(5 mg/mL),孵育4 h。弃去上清液,每孔加入200 μL DMSO溶

液,避光条件下震荡 10 min,用酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度(A)值。计算细胞抑制率和半数抑制浓度(IC_{50})值。

$$\text{细胞抑制率} = (1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}})$$

2.7 统计学分析

使用 SPSS 21 软件的单因素方差分析检验实验组之间的统计学差异,所得实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 HK 含量测定方法的建立

HK 含量在 0.01~200 $\mu\text{g/mL}$,峰面积与质量浓度呈现良好的线性关系,线性回归方程为 $Y=0.3373X+0.026$ ($R^2=1$),说明此方法可行。

3.2 HK-G2-Nps 的制备

马尔文粒度分析及 HPLC 检测结果见表 1 和图 3。数据显示,各药载比 HK-G2-Nps 的粒径均呈分布均一的单峰,说明分布较为集中,分散较为均匀。但载体 G2 的用量影响 HK-G2-Nps 的粒径大小,随着药载比的增加,制备得到的纳米粒径逐渐减小,

HK-G2-Nps 中 HK 的载药量得到了进一步提高。当药载比提高到 8:1 时,载药量达到 81.9%,纳米粒径减少到 109.4 nm。

3.3 HK-G2-Nps 的放置稳定性及不同介质稳定性考察

不同药载比的 HK-G2-Nps 在室温下放置 0、1、3、5 d 测的纳米粒粒径结果如图 4,粒径变化上下波动不大,基本平稳,且目视观察没有沉淀出现,说明室温下放置稳定。介质稳定性结果如图 5,目视 HK-G2-Nps 在 PBS、血浆、5% Glu、0.9%NaCl 介质

表 1 HK-G2-Nps 各药载比粒径及载药量结果

Table 1 Drug particle size and drug loading results of HK-G2-Nps with different drug loading ratios

HK-G2-Nps 药载比	粒径/nm	Zeta 电位/mV	PDI	DL
1:1	258.2	-35.1	0.228	43.45%
2:1	279.7	-36.1	0.171	55.20%
4:1	150.0	-36.0	0.099	73.79%
8:1	109.4	-35.5	0.233	81.90%

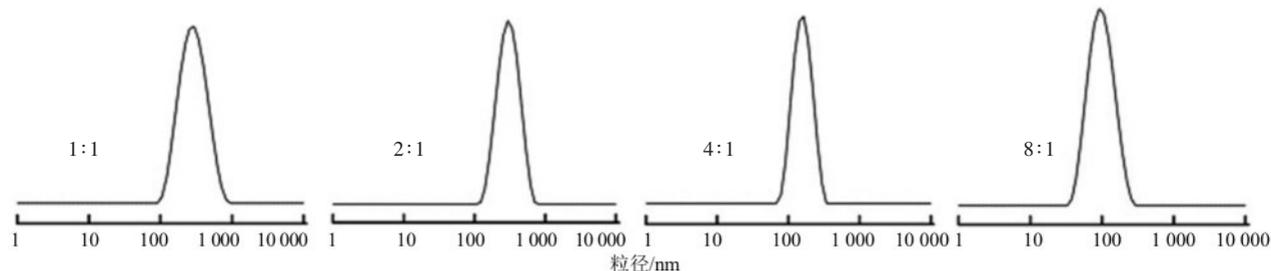


图 3 各药载比的 HK-G2-Nps 的粒径分布

Fig. 3 Particle size diatribution of HK-G2-Nps with different drug loading ratios

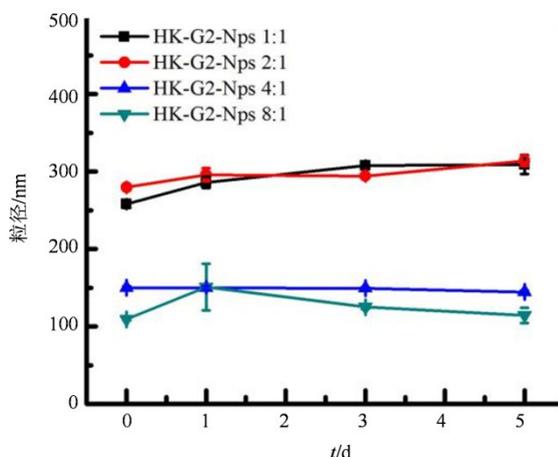


图 4 各药载比的 HK-G2-Nps 的放置稳定性($n=3$)

Fig. 4 Placement stability of HK-G2-Nps with different drug loading ratios($n=3$)

中,均没有沉淀或浑浊出现,但粒径数据显示,各药载比的 HK-G2-Nps 在 0.9%NaCl 中,纳米粒粒径明显增大,说明加入 0.9%NaCl, HK-G2-Nps 本身的稳定状态发生了变化,使得粒径急剧增大,不能稳定存在。各药载比的 HK-G2-Nps 均可以在 5% 葡萄糖溶液、PBS 缓冲液和血浆中稳定存在,说明 HK-G2-Nps 可以用 5% 葡萄糖溶液和 PBS 缓冲液调等渗,注射给药。

3.4 HK-G2-Nps 的形态学考察

由图 6 的电镜图可以看出,当药载比为 1:1 时,纳米粒没有均一的形态,当药载比为 2:1 时,纳米粒呈现出规则的类球状,当药载比为 4:1 时,呈现出规则均一的球形,而当药载比达到 8:1 时,纳米粒呈现出明显的立方柱状形态同时存在不规则球状。因此可推测纳米粒的形状可能受载体用量的影响,

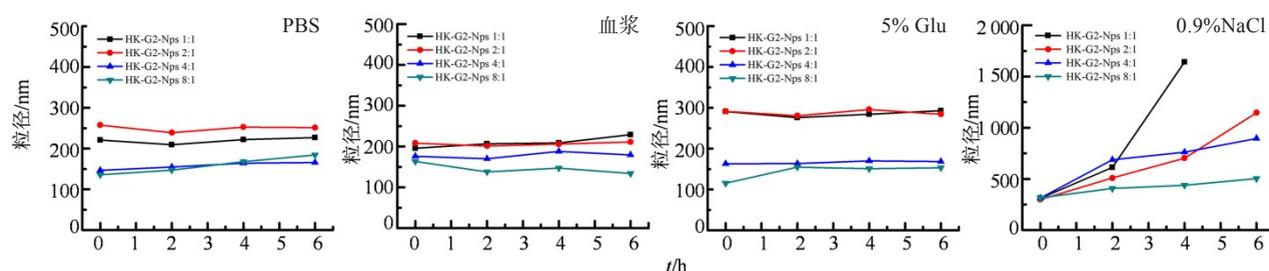


图5 各药载比的HK-G2-Nps的等渗介质中稳定性

Fig. 5 Lsokinetic stability of HK-G2-Nps with different drug loading ratios

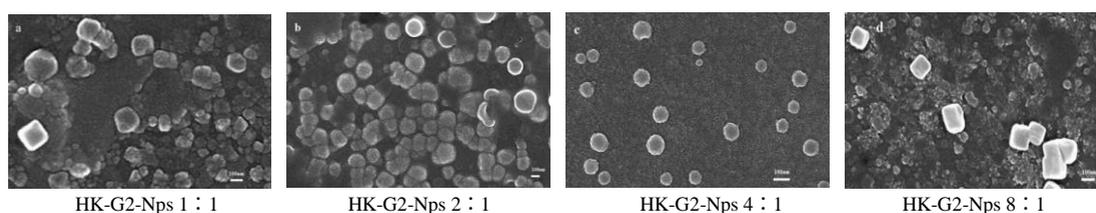


图6 各药载比的HK-G2-Nps的扫描电镜照片

Fig. 6 SEM photo of HK-G2-Nps with different drug loading ratios

随着药载比的增加,纳米粒形态逐渐稳定且呈现规则的球形,但当药载比继续增大至8:1时,纳米粒的形态又发生了转变,由单一的球状转变为立方柱状与球状共存的状态,可能是由于药载比过高,部分HK没有完全被G2包裹而形成两种形状共存的状态。由于电镜中测得为干粒子的粒径,而马尔文粒度仪测得的是粒子的水化平均半径,故SEM中显示的粒径较马尔文测得值有所偏差,此差异是由于测定方法不同造成的^[27]。

3.5 HK-G2-Nps的体外释放

HK-G2-Nps的释放分为2个阶段,结果见图7。在第一阶段即前24 h,纳米粒能够迅速释放,当药载比为4:1时,其累计释放最高,可达70%左右;24 h之后即第二阶段的缓速释放,4个药载比均缓慢释放至120 h,但药载比为1:1和2:1的累计释放率较4:1和8:1低,均在60%左右;而药载比达到8:1时,累计释放率可达89%,虽然略高于药载比为4:1的纳米粒(累计释放率为80%),但没有显著性差异。由此可推测HK-G2-Nps先速释后缓释的释放模式可以更好的发挥药效,可能是由于纳米粒的粒径对释放速率产生了影响,药载比较低时,纳米粒粒径偏大,纳米粒的比表面积较小,释放缓慢,而药载比增大时,纳米粒粒径减小,使纳米粒拥有较大的比表面积,对纳米粒的释放产生了促进作用,从而增大了释放速率。

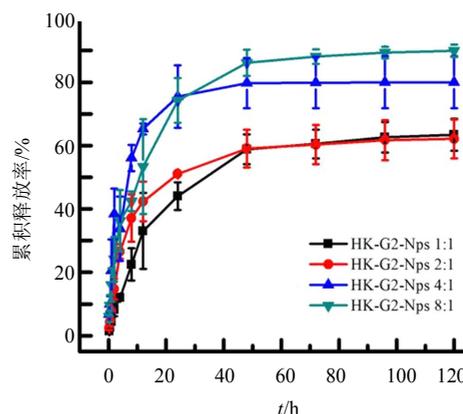
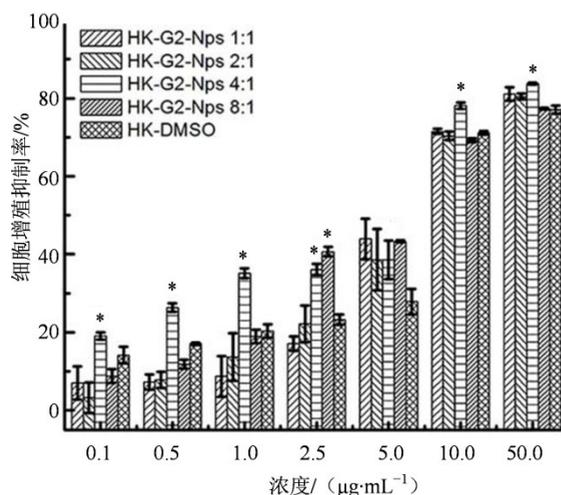


图7 各药载比的HK-G2-Nps在含0.5%SDS的PBS缓冲盐中的释放($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Release of HK-G2-Nps with different drug loading ratios in PBS containing 0.5% SDS($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 HK-G2-Nps的体外细胞毒作用

如图8所示,游离的HK及HK-G2-Nps对4T1细胞的抑制作用均呈现浓度相关性,同时HK-G2-Nps各药载比细胞增殖抑制率均大于游离组HK,药载比为4:1时作用最显著,质量浓度为50.0、10.0、2.5、1.0、0.5、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖抑制率均显著高于HK组($P < 0.01$)。各药载比的HK纳米粒对4T1细胞的 IC_{50} 值如表2所示,当药载比为1:1和2:1时, IC_{50} 值分别为6.30和6.70 $\mu\text{g/mL}$,没有明显差异,当药载比为4:1时, IC_{50} 值为3.83 $\mu\text{g/mL}$,较HK组降低了2倍,呈现显著性差异。但当药载比达到8:1时, IC_{50}



与HK-DMSO组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs HK-DMSO group

图8 各药载比的HK-G2-Nps对4T1细胞的细胞毒实验($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Proliferation inhibition of HK-G2-Nps with different drug loading ratios against 4T1 cells after 48 h of incubation($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表2 各药载比HK-G2-Nps对4T1细胞的IC₅₀值

Table 2 IC₅₀ Values of HK-G2-Nps with different drug loading ratios in 4T1 cells incubated for 48 h

组别	药载比	IC ₅₀ 值/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
HK-G2	1:1	6.30
	2:1	6.71
	4:1	3.83
	8:1	5.44
HK-DMSO	—	7.82

值为5.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并没有与HK的DMSO溶液组产生显著性差异,而且对细胞的抑制作用没有药载比为4:1的HK-G2-Nps强,这可能与纳米粒的形态存在一定关系。在药载比8:1时,有些HK呈现大粒径的立方体形态,粒径过大,无法进入细胞内部发挥细胞毒作用。

4 讨论

药载比对HK-G2-Nps的形态产生的影响是不容忽视的,当药载比较低时,纳米粒粒径较大,且形态分布不均一,导致纳米粒在释放过程中释放不完全,以至于对4T1细胞的抑制率较低。而当药载比过高时,通过马尔文粒度仪测得的粒径虽然较小,也可以明显提高载药量,但由SEM可以明显看出,其纳米粒的存在状态是以立方柱状和球状两种状态同时存在的,虽然在120 h累计释放率可达89%,

但由于其形态分布并非均一的,导致其对4T1细胞的杀伤作用并没明显的提高。而当药载比为4:1时,纳米粒的载药量已达到73.79%,纳米粒粒径为150 nm, PDI值可达0.099,粒径分布较为集中,且在释放过程中同样以先速释后缓释的释放模式释药,累计释放率可达80%,以4T1细胞为模型考察的细胞毒实验中,与HK组存在显著性差异,抑制率提高了2倍。这可能是由于纳米粒呈现出分布单一均匀的球形,有助于纳米粒进入细胞,更好的发挥药效。

本次研究是以一种新型的扇形支化聚合物为载体来制备高载药量的HK-G2-Nps,有效提高了纳米粒的载药量,解决了HK难溶于水的问题,同时增强了对4T1的细胞毒作用。筛选出的药载比为4:1的纳米粒的体外表征均展现了纳米制剂的优势,为HK-G2的体内研究提供了参考。

参考文献

- [1] Guo Y, Zhao Y, Wang T, et al. Honokiol nanoparticles stabilized by oligoethylene glycols codendrimer: *in vitro* and *in vivo* investigations [J]. J Mater Chem B, 2016, 5 (4). DOI:10.1039/C6TB02416E
- [2] 林琳, 丁一. 和厚朴酚最新药理学研究进展与评述 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(1): 110-112.
- [3] 季宇彬, 周欣欣, 国瑞琪, 等. 和厚朴酚纳米混悬剂的制备及其体内外研究 [J]. 药学学报, 2018, 53(1): 133-140.
- [4] 杨梅, 吕惠, 龚镜, 等. 紫外分光光度法测定和厚朴酚纳米乳的含量 [J]. 科学咨询(科技·管理), 2016, 32(8): 50-51.
- [5] 陈一桢, 张文娟, 唐兰如, 等. 和厚朴酚长循环脂质体的制备及药动学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3720-3727.
- [6] 蔡喆, 潘文合. 和厚朴酚泊洛沙姆F-127胶束的制备及其体外抗肿瘤研究 [J]. 中国现代应用药学, 2014, (2): 186-189.
- [7] 邓凤, 徐才兵, 贾运涛, 等. 和厚朴酚环糊精纳米海绵的制备及表征研究 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(16): 1390-1393.
- [8] Zhang H, Hu H, Zhang H, et al. Effects of PEGylated paclitaxel nanocrystals on breast cancer and its lung metastasis [J]. Nanoscale, 2015, 7(24): 10790-10800.
- [9] André M, Besse S, Chezal J M, et al. PEGylation enhances the tumor selectivity of melanoma-targeted conjugates [J]. Org Biomol Chem, 2014, 13(2): 388-397.
- [10] Xia F, Hou W, Zhang C, et al. pH-responsive gold nanoclusters-based nanoprobes for lung cancer targeted near-infrared fluorescence imaging and chemophotodynamic therapy [J]. Acta Biomater, 2017, 68: 308-

319. doi: 10.1016/j.actbio.2017.12.034.
- [11] Lassalle V, Ferreira M L. PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation [J]. *Macromol Biosci*, 2007, 7(6): 767-83.
- [12] Boffito M, Sirianni P, Di R A, et al. Thermosensitive block copolymer hydrogels based on poly (ϵ -caprolactone) and polyethylene glycol for biomedical applications: state of the art and future perspectives [J]. *J Biomed Mater Res, Part A*, 2015, 103(3): 1276-1290.
- [13] Sanders N N, Peeters L, Lentacker I, et al. Wanted and unwanted properties of surface PEGylated nucleic acid nanoparticles in ocular gene transfer [J]. *J. Controlled Release*, 2007, 122(3): 226-235.
- [14] Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2011, 63(3): 131-135.
- [15] Veronese F M. PEGylated protein drugs: basic science and clinical applications [M]. Germany: Birkhäuser Basel, 2009.
- [16] Jevsevar S, Kunstelj M, Porekar V G. PEGylation of therapeutic proteins [J]. *Biotechnol J*, 2010, 5(1): 113-128.
- [17] Ryan S M, Mantovani G, Wang X, et al. Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects [J]. *Expert Opin Drug Delivery*, 2008, 5(4): 371-383.
- [18] Jin J, Han Y, Zhang C, et al. Effect of grafted PEG chain conformation on albumin and lysozyme adsorption: A combined study using QCM-D and DPI [J]. *Colloids Surf B*, 2015, 136: 838-844.
- [19] Marruecos D F, Kastantin M, Schwartz D K, et al. Dense Poly (ethylene glycol) brushes reduce adsorption and stabilize the unfolded conformation of fibronectin [J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(3): 1017-1025.
- [20] Pasut G, Veronese F M. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2009, 61(13): 1177-1188.
- [21] Eun Ji P, Myung S K, Hye S L, et al. Differences in electrophoretic behavior between linear and branched PEG-conjugated proteins [J]. *Electrophoresis*, 2015, 36(6): 918-923.
- [22] 刘凤英, 于英杰, 郑增娟. 药物聚乙二醇化的研究进展 [J]. *海峡药学*, 2016, 28(7): 1-4.
- [23] 刘源, 周建平, 王伟. 聚乙二醇修饰靶向纳米制剂的研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2017, 48(3): 268-275.
- [24] Ogier J, Arnauld T, Doris E. Recent advances in the field of nanometric drug carriers [J]. *Future Med Chem*, 2009, 1(4): 693.
- [25] 任虹, 何瑶, 刘芳, 等. 厚朴酚与和厚朴酚 HPLC 含量测定方法及厚朴提取工艺研究 [J]. *中药与临床*, 2014, 5(2): 32-34.
- [26] 赵静. 新型两亲性药物载体的合成及表征 [D]. 郑州: 郑州大学, 2013.
- [27] Sharma G, Wilson K, van der Walle C F, et al. Microemulsions for oral delivery of insulin: design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 76(2): 159-169.