

维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯对宝藿苷 I 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响

严红梅^{1,2}, 贾晓斌^{1,2*}, 张振海^{1*}, 孙 娥¹, 宋 捷¹

1. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 考察非离子表面活性剂维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (TPGS) 对宝藿苷 I 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响。方法 MTT 法测定宝藿苷 I 对 MCF-7 的细胞毒性, 用荧光显微镜观察宝藿苷 I 的细胞摄取, 并采用 HPLC 法测定细胞内的宝藿苷 I 的量。结果 在应用 TPGS 后, 宝藿苷 I 对 MCF-7 增殖的抑制作用增强, 在宝藿苷 I 低浓度的情况下作用更显著; 当宝藿苷 I 与 TPGS 质量比分别为 1:1、1:2、1:4 时, 在 MCF-7 细胞培养 2 h 的摄取率分别为 29.51%、38.12%、40.37%, 与仅用宝藿苷 I 相比分别提高了 27.92%、65.24%、74.99%。结论 TPGS 能够增加 MCF-7 对宝藿苷 I 的细胞摄取, 并增强其对 MCF-7 的细胞毒作用。

关键词: 宝藿苷 I; 维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯; 乳腺癌细胞 MCF-7; 细胞毒性; 细胞摄取

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)03-0384-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.015

Effect of *D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate on inhibition of MCF-7 cell proliferation by baohuoside I

YAN Hong-mei^{1,2}, JIA Xiao-bin^{1,2}, ZHANG Zhen-hai¹, SUN E¹, SONG Jie¹

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) on the inhibition of proliferation of breast cancer cells MCF-7 by baohuoside I. **Methods** The cytotoxicity of baohuoside I to MCF-7 cells was determined by MTT assay, the cellular uptake of baohuoside I was detected by fluorescence microscopy, and the intracellular baohuoside I was determined by HPLC. **Results** The effect of baohuoside I on the inhibition of MCF-7 cell proliferation was enhanced in the presence of TPGS, especially on lower concentration. The uptake rates of MCF-7 within 2 h were 29.51%, 38.12%, and 40.37%, when the proportions of baohuoside I and TPGS were 1:1, 1:2, and 1:4, respectively. The ratios were increased by 27.92%, 65.24%, and 74.99% compared with those using baohuoside I only. **Conclusion** TPGS can increase the uptake rate of baohuoside I in MCF-7 cells and enhance the inhibition of MCF-7 cell proliferation.

Key words: baohuoside I; *D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate; breast cancer cell MCF-7; cytotoxicity; cell uptake

宝藿苷 I 是淫羊藿中特有的黄酮类成分, 具有明显的药理活性^[1-5]。但是宝藿苷 I 的水溶性和膜渗透性较差, 在 Caco-2 细胞转运实验中存在外排现象^[6]。维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (*D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS) 是维生

素 E 的水溶性衍生物, 具有两亲性和较大的分子表面积, 良好的非离子性表面活性剂, 已载入《美国药典》^[7]。也有文献报道, TPGS 可用作某些药物的吸收促进剂、*P*-糖蛋白抑制剂等^[8-9]。

本课题组前期采用 Caco-2 模型研究 TPGS 对宝

收稿日期: 2014-05-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274088, 81303275); 苏州 2013 年科技发展计划医疗器械与新医药专项 (ZXY2013022)

作者简介: 严红梅, 博士研究生, 研究方向为中药药剂新剂型。Tel: (025)85608672 E-mail: yanhongmei0716@163.com

*通信作者 贾晓斌, 博士生导师。Tel/Fax: (025)85637809 E-mail: jiaxiaobinpharmacy@163.com

张振海, 助理研究员。Tel/Fax: (025)85637809 E-mail: davidpharm@aliyun.com

藿苳 I 吸收转运的影响,发现在应用 TPGS 后,宝藿苳 I 的外排比例得到下降,说明 TPGS 可以显著促进宝藿苳 I 的吸收^[10]。研究表明,宝藿苳 I 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖有较好的抑制作用^[11],为进一步提高其药效,本实验通过考察宝藿苳 I 对 MCF-7 的细胞毒性作用和细胞摄取率,研究 TPGS 对宝藿苳 I 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂

宝藿苳 I 对照品(自制,质量分数>98%);TPGS (Aladdin,批号 L1303022);顺铂(南京制药厂有限公司,批号 20140411);RPMI 1640 培养基(南京凯基生物科技发展有限公司);胰蛋白酶(Sigma 公司);胎牛血清(Gibco);甲醇为色谱纯,水为高纯水,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);数显气浴恒温振荡器(金坛市双捷实验仪器厂);BP-211D 分析电子天平(德国 Sartorius 公司);CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 细胞

人乳腺癌细胞 MCF-7(南京凯基生物科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 HPLC 法测定宝藿苳 I 方法学考察

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取宝藿苳 I 对照品 6.27 mg,置于 10 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得 627.0 μg/mL 对照品储备液。精密移取宝藿苳 I 储备液分别加甲醇稀释成质量浓度为 62.70、25.08、12.54、6.27、2.51 μg/mL 对照品溶液,备用。

2.1.2 色谱条件^[1] 色谱柱 Heder C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(75:25);检测波长 270 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 °C;进样量 20 μL。

2.1.3 线性关系考察 取“2.1.1”项中配制的系列对照品溶液,按上述色谱条件测定,以对照品溶液的进样质量浓度(C)为横坐标,峰面积积分值(A)为纵坐标,得到标准曲线: $A=38.358C-6.3017$, $r=0.9998$,结果显示,宝藿苳 I 在 2.51~62.70 μg/mL 线性关系良好。

2.1.4 稳定性试验 分别配制宝藿苳 I 浓度为 20

μmol/L,TPGS 浓度分别为 0、20、40、80 μmol/L 的溶液,置 37 °C 恒温水浴中,分别于 0、2、4、8、12 h 进样,测定宝藿苳 I 峰面积,考察宝藿苳 I 溶液在 12 h 内保持稳定,没有发生降解或沉淀。

2.1.5 重复性试验 平行制备 5 份供试品溶液,进行测定,结果宝藿苳 I 质量浓度的平均值为 26.17 μg/mL, RSD 为 0.94%,表明此测定方法重复性良好。

2.1.6 加样回收率试验 按照《中国药典》2010 年版二部附录 XIXA 项下方法,分别设计高、中、低 3 个质量浓度,每个质量浓度各制备 3 份供试品溶液,进行加样回收率试验。结果平均加样回收率为 99.63%, RSD 为 1.31%,表明此测定方法回收率良好。

2.2 宝藿苳 I 的溶解度测定

按照文献报道的方法^[12],测定宝藿苳 I 及其与 TPGS 的混合物在水中的溶解度。分别称取过量的宝藿苳 I、宝藿苳 I 和 TPGS(浓度比分别为 1:1、1:2、1:4)的物理混合物于 5 mL 双蒸水中,超声至药物不再溶解,放入恒温振荡器中,温度保持(25±2) °C,振摇 24 h,3 000 r/min 离心 15 min,吸取适量饱和上清液,乙醇稀释至线性范围,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按“2.1.2”项色谱条件进行 HPLC 测定。

2.3 细胞毒性实验^[13]

取状态良好并处于对数生长期的乳腺癌细胞 MCF-7,胰酶消化后,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基稀释至细胞密度为 1×10^5 个/mL,吹打均匀后取 100 μL 细胞悬液于 96 孔板,置 37 °C 培养箱孵育 24 h 使其贴壁。将宝藿苳 I、宝藿苳 I-TPGS(1:2)用少量二甲基亚砜(DMSO)溶解,并以无血清的 RPMI 1640 培养基分别稀释成系列浓度(DMSO 体积分数低于 0.1%),顺铂注射液以无血清的 RPMI 1640 培养基稀释成系列浓度,将所配制的各试药分别加入 96 孔板中,每孔加 100 μL,每个浓度 6 个平行孔,以正常培养基为对照,将培养板继续置于培养箱中孵育 24 h 后,每孔加入 10 μL MTT 溶液,置培养箱中孵育 4 h。甩板,吸干孔内残留液体,每孔加入 100 μL DMSO,于振荡器上振荡 10 min 以溶解蓝紫色结晶物。在 570 nm 波长下,用酶标仪测定吸光度(A)值,计算细胞存活率^[14]。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}}$$

考察宝藜苣 I 与不同比例 TPGS 的混合物对 MCF-7 细胞抑制作用时, TPGS 单用的浓度设为 80 $\mu\text{mol/L}$, 宝藜苣 I 的浓度设为 20 $\mu\text{mol/L}$, 宝藜苣 I 与 TPGS 比例设为 1:1、1:2、1:4; 考察 TPGS 对不同浓度宝藜苣 I 对 MCF-7 细胞增殖抑制的促进作用时, 宝藜苣 I 的浓度设为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$, 宝藜苣 I 与 TPGS 的比例固定为 1:2, 其他操作同上。

2.4 细胞摄取实验

将 MCF-7 细胞接种于 6 孔培养板中, 细胞培养箱中培养 24 h, 使其贴壁移去原有培养基, 分别加入经无血清培养基稀释的宝藜苣 I (20 $\mu\text{mol/L}$) 或宝藜苣 I-TPGS (1:1)、宝藜苣 I-TPGS (1:2)、宝藜苣 I-TPGS (1:4) 混合物, 孵育 2 h, 孵育结束后, 快速弃去培养基, 加入冷的 PBS 终止细胞摄取, 并冲洗细胞 3 遍。加入 1 mL 蒸馏水, 刮取细胞, 将细胞悬液收集并置于冰浴下超声破碎细胞, 离心, 吸取上清液于另一干净离心管中, 用氮气吹干, 甲醇溶解, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 定容至 1 mL, 供 HPLC 测定宝藜苣 I^[15]。

考察摄取率与宝藜苣 I 浓度的关系时, 宝藜苣 I 的浓度分别设为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$, 宝藜苣 I 与 TPGS 的浓度比固定为 1:2; 考察摄取率与摄取时间的关系时, 宝藜苣 I 的浓度设为 20 $\mu\text{mol/L}$, 宝藜苣 I 与 TPGS 的浓度比固定为 1:2, 分别孵育 1、2、4 h, 其他操作同上。

2.5 统计学方法

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件处理数据, 组间比较行单因素方差分析。

3 结果

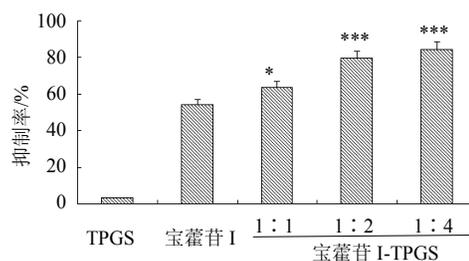
3.1 宝藜苣 I 的溶解度

结果显示, 宝藜苣 I、宝藜苣 I-TPGS (1:1)、宝藜苣 I-TPGS (1:2)、宝藜苣 I-TPGS (1:4) 在水中的表观溶解度分别为 (12.72 \pm 0.32)、(69.41 \pm 0.95)、(113.43 \pm 2.18)、(152.21 \pm 3.46) $\mu\text{g/mL}$, 提示 TPGS 的加入能提高宝藜苣 I 在水中的溶解度, 并且随着 TPGS 比例的增加, 宝藜苣 I 在水中的溶解度也逐渐增大, 说明 TPGS 能显著提高宝藜苣 I 的水溶性, 改善其理化性质。原因可能是 TPGS 本身是一种非离子性表面活性剂, 当 TPGS 达到一定浓度时, 会通过胶束增溶作用, 改善难溶性药物的溶解性能。

3.2 细胞毒性比较

宝藜苣 I、宝藜苣 I-TPGS (1:2) 以及阳性药

顺铂孵育 MCF-7 细胞 24 h 后的半数生长抑制浓度 (IC_{50}) 值分别为 (18.51 \pm 0.31)、(12.18 \pm 0.22)、(4.3 \pm 0.27) $\mu\text{mol/L}$, 发现与宝藜苣 I 相比, 加入 TPGS 的药物组的 IC_{50} 值降低, 差异具有显著性。MCF-7 细胞用宝藜苣 I (20 $\mu\text{mol/L}$)、TPGS (80 $\mu\text{mol/L}$) 和宝藜苣 I-TPGS (1:1)、宝藜苣 I-TPGS (1:2)、宝藜苣 I-TPGS (1:4) 孵育 24 h 的细胞抑制率见图 1。空白辅料 TPGS 在 MCF-7 细胞中孵育 24 h, 80 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞抑制率在 5% 以下, 说明 TPGS 是安全无毒的药用辅料。宝藜苣 I 与不同比例 TPGS 的混合物对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用均高于宝藜苣 I 原料药组, 且差异具有显著性 ($P < 0.05$ 、0.001)。



与宝藜苣 I 组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$, 下同
* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs baohuoside I group, same as below

图 1 TPGS、宝藜苣 I、宝藜苣 I 与不同比例 TPGS 的混合物对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Inhibition of TPGS, baohuoside I, and mixtures of baohuoside I and TPGS in different ratios on proliferation of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图 2 反映了 TPGS (宝藜苣 I 与 TPGS 的浓度比固定为 1:2) 对不同浓度宝藜苣 I (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 MCF-7 细胞增殖的促进作用, 结果显示, TPGS 促进低浓度的宝藜苣 I 抑制细胞增殖的作用更强, 即当宝藜苣 I 浓度分别为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 时, TPGS 使其对 MCF-7 细胞增殖抑制率分别提高 55.08%、43.92%、11.95%。

3.3 细胞摄取研究

细胞摄取实验结果见表 1~3, 相比宝藜苣 I 原料药, 宝藜苣 I 与不同比例 TPGS 的混合物作用后 MCF-7 细胞对宝藜苣 I 的摄取率均有所提高, 且随着 TPGS 比例的增加, 宝藜苣 I 也更容易被 MCF-7 细胞摄取, 并且宝藜苣 I、宝藜苣 I-TPGS (1:2) 作用后细胞对宝藜苣 I 的摄取率在 1~4 h 内有一定的浓度和时间相关性。

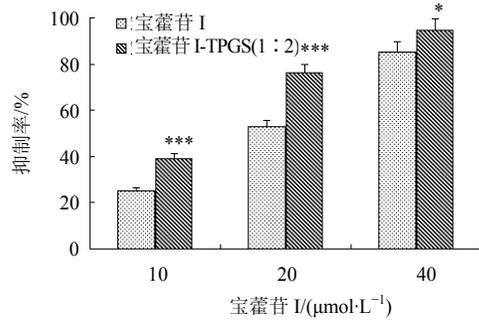


图 2 TPGS 对不同浓度宝藜苣 I 抑制 MCF-7 细胞增殖的促进作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Promotion of TPGS on inhibition of baohuoside I at different concentration on proliferation of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 宝藜苣 I、宝藜苣 I 与不同比例 TPGS 的混合物作用 MCF-7 细胞 2 h 后细胞对宝藜苣 I 的摄取率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Uptake rates of baohuoside I in MCF-7 cells treated with baohuoside I and mixtures of baohuoside I and TPGS in different ratios for 2 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	细胞摄取率/%	提高率/%
宝藜苣 I (20 μmol·L ⁻¹)	23.07 ± 0.35	—
宝藜苣 I-TPGS (1 : 1)	29.51 ± 0.44**	27.92
宝藜苣 I-TPGS (1 : 2)	38.12 ± 0.54*	65.24
宝藜苣 I-TPGS (1 : 4)	40.37 ± 0.66*	74.99

与宝藜苣 I 组比较: **P < 0.01

**P < 0.01 vs baohuoside I group

表 2 不同浓度宝藜苣 I、宝藜苣 I-TPGS (1 : 2) 作用 MCF-7 细胞 2 h 后细胞对宝藜苣 I 的摄取率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Uptake rates of baohuoside I in MCF-7 cells treated with baohuoside I at different concentration and mixtures of baohuoside I and TPGS (1 : 2) for 2 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	细胞摄取率/%		
	10 μmol·L ⁻¹	20 μmol·L ⁻¹	40 μmol·L ⁻¹
宝藜苣 I	12.17 ± 0.32	22.39 ± 0.41	34.48 ± 0.43
宝藜苣 I-TPGS (1 : 2)	22.26 ± 0.42***	38.45 ± 0.48*	54.11 ± 0.63*

4 讨论

TPGS 在制剂中可作为增溶剂^[16]、吸收促进剂^[17]以及固体分散体的载体等,还可以抑制 P-糖蛋白的外排作用,提高受 P-糖蛋白阻滞的药物的生物利用度,对于难溶性药物是一种良好的非离子性表面活性剂。与其他表面活性剂相比,TPGS 具有的生育酚酯结构,具有一定的抗氧化性,有助于增加制剂的稳定性^[18]。

表 3 宝藜苣 I (20 μmol/L)、宝藜苣 I-TPGS (1 : 2) 作用 MCF-7 细胞不同时间后细胞对宝藜苣 I 的摄取率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Uptake rates of baohuoside I in MCF-7 cells treated with baohuoside I (20 μmol/L) and mixtures of baohuoside I and TPGS (1 : 2) for different times ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	细胞摄取率/%		
	1 h	2 h	4 h
宝藜苣 I (20 μmol·L ⁻¹)	12.45 ± 0.22	22.75 ± 0.39	27.63 ± 0.42
宝藜苣 I-TPGS (1 : 2)	22.15 ± 0.31***	39.28 ± 0.53*	51.83 ± 0.67*

本研究通过细胞毒性实验和细胞摄取实验考察了 TPGS 对宝藜苣 I 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响,MTT 实验结果表明在应用 TPGS 后,宝藜苣 I 对 MCF-7 增殖的抑制作用增强,对这一现象的研究显示,TPGS 能通过胶束增溶作用改善宝藜苣 I 的溶解性能;另外,已有的研究表明,宝藜苣 I 在 Caco-2 细胞转运实验中存在明显的外排现象^[5],而低浓度的 TPGS 可以通过抑制 ATP-酶而抑制 ATP-酶介导的 P-糖蛋白外排^[19],因此能提高宝藜苣 I 被 MCF-7 细胞的摄取率。相比宝藜苣 I 原料药,宝藜苣 I 与不同比例 TPGS 的混合物的细胞摄取率均有所提高,这一实验结果进一步证实了 TPGS 能促进宝藜苣 I 的抗乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的作用。

参考文献

- [1] 金晓勇, 贾晓斌, 蔡宝昌, 等. 炙淫羊藿炮制过程中 5 种黄酮类成分变化规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2738-2742.
- [2] Song J, Shu L, Jia X B, et al. Reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway is involved in baohuoside I-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer [J]. *Chem Biol Interact*, 2012, 199(1): 9-17.
- [3] 贾晓斌, 兰雪莲, 陈彦, 等. 淫羊藿黄酮类成分抗骨质疏松作用及其机制研究进展 [J]. 中国药房, 2010, 21(3): 269-270.
- [4] 刘晓霞, 张永泽, 李振红, 等. 宝藜苣 I 对食道癌细胞 Eca-109 Wnt/β-catenin 信号转导通路的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 124-126.
- [5] 韩惠, 单淇, 周福军, 等. 箭叶淫羊藿中化学成分及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 269-273.
- [6] 陈彦, 贾晓斌. Caco-2 细胞单层研究淫羊藿黄酮类成分的吸收转运 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 220-224.
- [7] 杜广盛, 李德馨, 魏振平. 聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯在纳米制剂中应用进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(12): 981-987.
- [8] 金朝辉, 徐珽, 马音, 等. 口服吸收促进剂研究进

- 展概述 [J]. 华西医学, 2008, 23(4): 940-942.
- [9] Dintaman J M, Sliverman J A. Inhibition of P-glycoprotein by *D*- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) [J]. *Pharm Res*, 1999, 16(10): 1550-1556.
- [10] 金鑫, 张振海, 贾晓斌, 等. 维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯对 Caco-2 细胞模型转运宝藿昔 I 的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2474-2478.
- [11] Huang C Q, Chen X G, Guo B L, *et al.* Induction of apoptosis by Icariside II through extrinsic and intrinsic signaling pathways in human breast cancer MCF7 cells [J]. *Biosic Biotechnol Biochem*, 2012, 76(7): 1322-1328.
- [12] 贾东升, 赵江丽, 贾晓斌, 等. 淫羊藿苷元磷脂复合物的制备及其固体分散体研究 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1449-1453.
- [13] 刘艳华, 孙进, 王文苹, 等. 包载紫杉醇的透明质酸聚合物胶束细胞毒性及细胞摄取研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 271-274.
- [14] Taetz S, Bochot A, Surace C, *et al.* Hyaluronic acidmodified DOTAP/DOPE liposomes for the targeted delivery of anti-telomerase si RNA to CD44-expressing lung cancer cells [J]. *Oligonucleotides*, 2009, 19(2): 103-116.
- [15] 黄灿, 许杜鹃, 夏泉, 等. HPLC 法测定肿瘤细胞中 5-氟尿嘧啶的浓度 [J]. 安徽医药, 2012, 16(2): 173-174.
- [16] Gao Y, Li L B, Zhai G X. Preparation and characterization of Pluronic/TPGS mixed micelles for solubilization camptothecin [J]. *Colloid Surf Biointerfaces*, 2008, 64(2): 194-199.
- [17] Shien M J, Hsu C Y, Huang L Y. Reveasal of doxorubicin-resistance by multifunctional nanoparticles in MCF-7/ADR cells [J]. *J Controlled Release*, 2011, 152(3): 418-425.
- [18] 于永新, 俞红凯, 王中彦, 等. 聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯应用进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(6): 407-412.
- [19] Collnot E M, Baldes C, Schaefer U F, *et al.* Vitamin E TPGS P-glycoprotein inhibition mechanism: influence on conformational flexibility, intracellular ATP levels, and role of time and site of access [J]. *Mol Pharm*, 2010, 7(3): 642-651.