

靶向熊果酸脂质体的制备及其体外靶向性研究

杨 光

江汉大学医学院, 湖北 武汉 430056

摘要: **目的** 制备靶向熊果酸脂质体, 并评价其对宫颈癌 HeLa 细胞的体外靶向性。**方法** 采用化学合成方法制备新型的靶向性功能材料叶酸-CONH-聚乙二醇-NH-胆固醇, 以薄膜分散法制备靶向熊果酸脂质体; 构建以钙黄绿素为荧光探针标记物的脂质体, 用荧光共聚焦倒置显微镜观察靶向脂质体对 HeLa 细胞的穿透能力; 以流式细胞术考察靶向脂质体的摄取效率。同时, 考察靶向熊果酸脂质体对 HeLa 细胞的生长抑制作用。**结果** 薄膜分散法制备的靶向熊果酸脂质体对 HeLa 细胞具有明显的靶向作用, 并且具有显著的细胞增殖抑制作用。**结论** 靶向熊果酸脂质体可有效穿透 HeLa 细胞, 且具有较强的杀伤宫颈癌细胞活性的作用。

关键词: 熊果酸; 靶向脂质体; 薄膜分散法; 宫颈癌; 钙黄绿素; HeLa 细胞

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)17-4045-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.17.012

Preparation of targeted ursolic acid liposome and its *in vitro* targeting effect

YANG Guang

College of Medicine, Jianghan University, Wuhan 430056, China

Abstract: Objective To prepare the targeted ursolic acid liposome and evaluate its targeting and inhibitory effects on HeLa cells *in vitro*. **Methods** Using folate receptors as cell targets, the new functional targeted material Folate-CONH-PEG-NH-Cholesterol conjugate was synthesized chemically. Ursolic acid liposome was developed by modifying Folate-CONH-PEG-NH-Cholesterol using film dispersed method. The liposome was constructed with calcein as a fluorescent probe marker, and the penetrating ability of targeted liposome on HeLa cells was observed by fluorescence confocal microscopy. The uptake efficiency of targeted liposome was investigated by flow cytometry. Meanwhile, the growth inhibitory effect of ursolic acid liposome on HeLa cells was investigated. **Results** The targeted ursolic acid liposome prepared by thin dispersion method had obvious targeting effect on HeLa cells and have significant anti-proliferative effect. **Conclusion** The targeted ursolic acid liposome can effectively penetrate HeLa cells with great killing power on the activity of cervical cancer cells.

Key words: ursolic acid; targeted liposome; thin dispersion method; cervical cancer; calcein; HeLa cells

熊果酸(ursolic acid, UA)是一种广泛存在于天然植物如中草药及水果中的五环三萜类化合物。UA 具有镇静、抗菌、抗溃疡、抗氧化、抗炎抗变态反应^[1-2]、抗糖尿病^[3-4]、降低血糖等多种生物学效应, 还具有调血脂、抗肥胖^[5-6]、抗动脉粥样硬化^[7]及改善学习记忆、保护神经等功效^[8]。同时, 最为广大研究人员所关注的是它所具备的抗肿瘤功效, 有研究表明它对多种肿瘤, 如肺癌、肝癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、白血病以及脑胶质瘤等有明显抵抗作用^[9-10]。

虽然, UA 具有广泛的生物学效应, 其抗肿瘤

作用也备受关注。但它几乎不溶于水, 在水中饱和溶液质量浓度为 $7.16 \mu\text{g/L}$ ^[11-12], 渗透性极低, 溶出慢; 且通过胃肠黏膜的渗透量有限, 所以口服生物利用度低, 这一缺点限制了其在医学领域的广泛应用^[13]。因此, 迫切需要寻找一种有效的方法来改善其使用局限性。脂质体作为一种新型的药物载体, 能提高药物的溶解速率、增强其缓释性、降低其毒副作用^[14-16]; 利用某些肿瘤大量表达叶酸受体的特性, 采用自行合成的叶酸靶向功能性材料叶酸-CONH-聚乙二醇-NH-胆固醇(FA-CONH-PEG-NH-CHOL)对脂质体表面进行结构修饰制备成肿瘤靶

收稿日期: 2018-04-16

基金项目: 博士资助项目科研启动经费 032 号

作者简介: 杨 光 (1977—), 女, 博士研究生, 研究方向为药物靶向制剂的研究。Tel: (027)84397569 E-mail: sunshine77@126.com

向脂质体, 进一步提高药物的稳定性及靶向性。靶向材料分子结构中的 C-N 键能够增加脂质体的水解稳定性, 并且, 它为中性分子不带电荷, 更加确保其稳定性。同时, 本实验以钙黄绿素作为荧光探针标记物制备靶向脂质体评价 FA-CONH-PEG-NH-CHOL 的体外靶向性, 并考察靶向熊果酸脂质体对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制活性, 为靶向熊果酸脂质体的抗肿瘤应用提供实验基础。

1 仪器与材料

EYELA N-1100S-WD 型旋转蒸发仪, 上海普渡生化有限公司; DF-101S 型恒温加热磁力搅拌器, 郑州长城科工贸有限公司; DZF-6090 型真空干燥箱, 上海林频仪器有限公司; TG16-II 型台式离心机, 长沙平凡仪器仪表有限公司; PLPHA 2-4 型冷冻干燥机, 美国 VirTis 公司; 高压挤出器, 加拿大 Northern Lipids Inc.; 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Zeta-PALS 激光粒度及电位分析仪, 美国 Brookhaven Instruments Corporation; IX71 型荧光聚焦倒置显微镜, 日本 OLYMPAS 公司; 流式细胞分析仪, 美国 BD Biosciences 公司; 酶标仪, 芬兰 Thermo Labsystems 公司。

Sephadex G25 凝胶柱, 瑞士 Amersham Biosciences 公司; CL-4B 凝胶柱, 美国 Sigma-Aldrich Chemical Co.; 氢化大豆磷脂 (HSPC), 美国 Avanti Polar Lipids Inc.; 胆固醇 (CHOL), 比利时 Acros organics 公司; 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE), 德国 Lipoid 公司; 聚乙二醇二胺 (PEG-bis-amine), 美国 Sigma-Aldrich Chemical Co.; dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 和 *N*-hydroxysuccinimide (NHS), 百灵威化学技术有限公司; 钙黄绿素 (calcein), 阿拉丁化学制品有限公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT), 飞弈科技有限公司; UA, 质量分数 98%, 华中科技大学同济医学院药学院; 叶酸 (folic acid, FA)、三乙胺 (triethylamine, TEA) 等其他试剂均为国产分析纯, 中国国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 靶向功能性材料 FA-CONH-PEG-NH-CHOL 的合成

2.1.1 FA-PEG-bis-amine 的合成 精密称取 26.5 mg 的 FA (60 μmol) 溶于 1 mL DMSO 中, 再依次加入 167.5 mg 的 PEG-bis-amine (50 μmol)、15.5 mg DCC (75 μmol)、8.63 mg NHS (75 μmol) 和 34.8 μL

TEA (7.18 mol), 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 通入氮气, 避光搅拌反应过夜; 再于 7 000 $\times g$ 离心反应过夜的产物 7~10 min, 取上清; 加入 50 mmol/L Na_2CO_3 3 mL 4 000 $\times g$ 再次离心 10~15 min; 将离心后的上清过 Sephadex G25 柱进行纯化以去除未反应的小相对分子质量副产物, 过柱纯化后的产物进行冷冻干燥, 得淡黄色絮状粉末。

2.1.2 胆固醇-*p*-甲苯磺酸盐 (CHOL-OTs) 的合成 精密称取 30 mL 吡啶、5 g 的 CHOL (12.93 mmol) 和 2.71 g 4-对甲苯磺酰氯 (TsCl, 14.22 mmol) 混合均匀后于 25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 12 h; 反应后的产物加入 25 mL 超纯水后用乙醚萃取 3 次; 合并有机相后干燥, 残留物用石油醚重结晶。

2.1.3 终产物 FA-CONH-PEG-NH-CHOL 的合成 取 128 mg FA-PEG-bis-amine (33.9 μmol)、22.3 mg CHOL-OTs (42.3 μmol) 与 11.8 μL 的 TEA (7.18 mol/L) 共溶于 20 mL 氯仿中, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应约 48 h; 反应结束后的产物于 37 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋转蒸发, 以除尽残留的氯仿; 上述产物再加 8 mL 50 mmol/L 的 Na_2CO_3 室温水化后超声处理, 于 4 000 $\times g$ 离心 20 min 后取上清; 将上清装入 14 000 透析袋于超纯水中透析 72 h 以除去小相对分子质量的副产物; 透析结束后, 将产物进行冷冻干燥处理, 即得淡黄色粉末状终产物, 回收率约 82%, 质量分数大于 80%。合成路线如图 1 所示。

同时, 用飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 对终产物进行结构验证。所合成的靶向功能性材料含聚乙二醇 (PEG), 该高分子聚合物的相对分子质量为 3 500 左右, 靶向合成材料的平均相对分子质量约为 4 140。从图 2 可看到一系列以相对分子质量 4 100 为中心的正态均匀分布的峰值, 与所合成终产物的相对分子质量基本吻合, 从而证实所合成的高分子聚合物为所需要的目标化合物。

2.2 靶向性功能材料的靶向摄取效率验证

2.2.1 钙黄绿素脂质体的制备 采用薄膜水化和聚酯纤维膜挤压的方法制备含荧光标记物钙黄绿素脂质体。首先合成靶向脂质体, 将 HSPC/CHOL/DSPE/FA-CONH-PEG-NH-CHOL 以物质的量比 55:40:4.5:0.5 共溶于 5 mL 氯仿中, 再经 37 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋转蒸发除尽残余有机溶剂; 取 2 mL 钙黄绿素 (50 mmol/L) 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水化脂质膜; 最后, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴通入氮气的条件下, 过聚酯纤维膜高压挤出器, 依次经过 200、100 nm 滤膜进行整粒。非靶向脂质

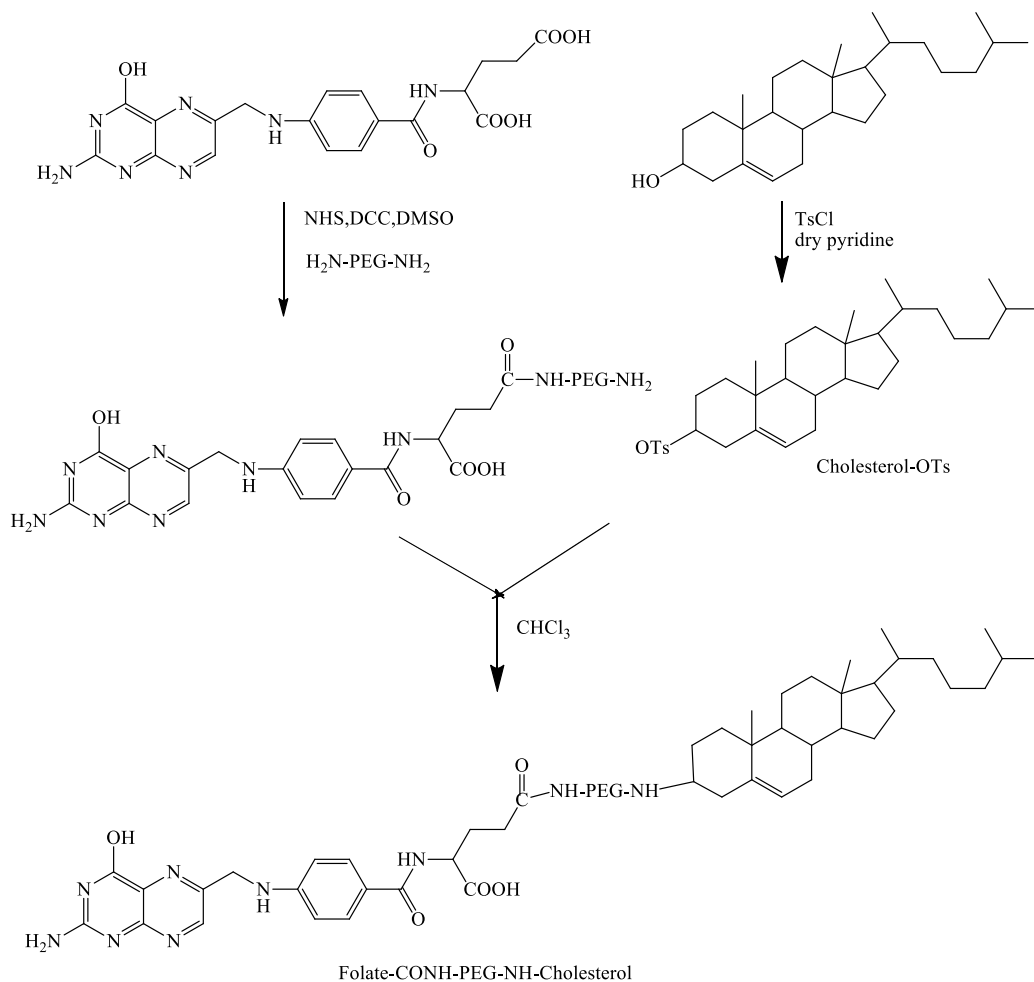


图 1 FA-CONH-PEG-NH-CHOL 靶向材料的合成路线图

Fig. 1 Synthesis scheme of targeted materials FA-CONH-PEG-NH-CHOL

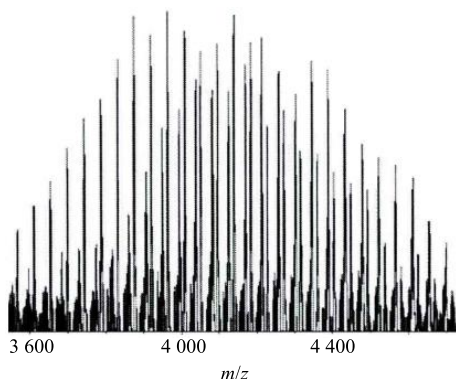


图 2 飞行时间质谱分析图

Fig. 2 Analysis graphics of MALDI-TOF-MS

体的制备同上，仅不加靶向材料。

2.2.2 靶向 UA 脂质体的制备 称取 HSPC/CHOL/FA-CONH-PEG-NH-CHOL/mPEG2000-DSPE 物质的量比为 63 : 32 : 0.5 : 4.5，UA（药脂比 1 : 20），溶于一定量的氯仿中，于 37 ℃ 至旋转蒸发仪上减压旋转蒸发，至梨形瓶内壁形成一层脂质薄膜。然后，

于 60 ℃ 用 2 mL pH 6.8 PBS 水化脂质膜。水化后的脂质膜过 0.22 μm 滤膜，用高压挤出器进行整粒，即得乳白色半透明脂质体混悬液。

2.2.3 靶向 UA 理化性质研究 取适量靶向 UA 脂质体用超纯水稀释至一定质量浓度，将脂质体样品置于比色皿中，用 Zeta-PALS 激光粒径电位分析仪测定样品的粒径、分散系数及电位。

经激光粒度分析仪处理、分析，测得 UA 隐形纳米脂质体的平均粒径为 (148.9 ± 2.5) nm（图 3）；分散系数（PDI）为 0.102 ± 0.025 。说明在现有的制备工艺条件下，所制备的 UA 脂质体粒度分布窄，大小分布均匀，完全能够满足制剂要求。

经电位分析仪测试 UA 隐形纳米脂质体的 Zeta 电位值为 (-17.65 ± 0.65) mV（图 4）。表明该体系稳定性良好。

通过 $3\,000 \times g$ 低速离心 10 min，可除去大颗粒及未包封的游离 UA，取离心后的脂质体，加入 2 mL

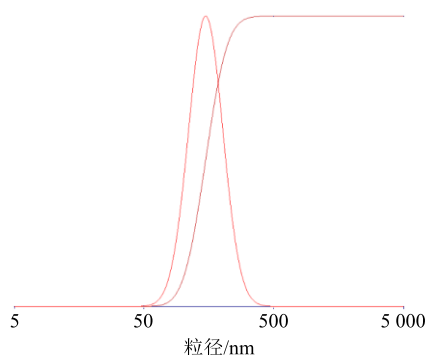


图 3 UA 脂质体粒径分布图

Fig. 3 Particle size distribution of UA liposomes

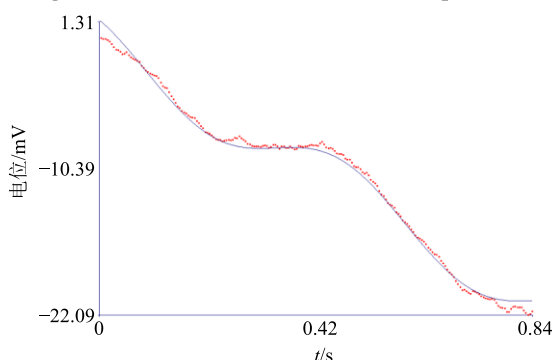


图 4 UA 脂质体 Zeta 电位

Fig. 4 Zeta potential of UA liposomes

甲醇 (HPLC 级) 破乳至澄清, 用于测定所包封的药物含量。另取制备的总脂质体混悬液 (未离心) 0.5 mL, 加入 2 mL 甲醇 (HPLC 级) 破乳至澄清, 用于测定总的药物含量。根据标准曲线测定所包封的及总的药物含量, 根据公式: 包封率 = 脂质体中包封的药物质量 / 总的药物质量, 载药量 = 脂质体中包封的药物质量 / 纳米脂质体质量。

依据最佳工艺处方制备了 3 个批次的 UA 隐形纳米脂质体, 分析计算其载药量分别为 (6.15 ± 0.5) %、(7.26 ± 0.6) %、(6.57 ± 0.4) %, 包封率分别为 (89.8 ± 9.3) %、(87.6 ± 5.2) %、(91.7 ± 8.5) %, 结果无显著差异性。

2.2.4 靶向 UA 脂质体稳定性研究 取靶向 UA 脂质体储存于 pH 7.4 的 PBS 缓冲体系中, 分别于室温及 4 °C 保存。3 个月后, 测定其粒径、电位、分散系数及包封率的变化情况。如表 1 所示, 在 4 °C 条件下保存的脂质体, 其包封率有所下降, 变化幅度控制在 10% 以内, 因此, 脂质体在 4 °C 冰箱中保存其稳定性是相当高的; 但是贮存于室温下的脂质体其包封率有明显的下降, 说明室温会导致其严重渗漏, 所以, 脂质体必须贮存于 4 °C 条件下或通过冷冻干燥的方法制备冷冻干燥制剂可长期保存。同

表 1 靶向 UA 脂质体稳定性分析数据 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 1 Stability analysis data of targeted UA liposomes ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

贮藏时间	粒径/nm	Zeta 电位/mV	分散系数	包封率/%
0 个月	148.9 ± 2.5	-17.65 ± 0.65	0.102 ± 0.025	89.7 ± 7.6
3 个月	153.8 ± 2.2	-11.24 ± 1.89	0.216 ± 0.009	71.3 ± 8.5

时还检测了在室温及 4 °C 贮藏 3 个月后的靶向脂质体形态的变化, 其粒径大小、Zeta 电位、分散系数变化不大, 说明所制备的靶向 UA 脂质体稳定性很高。

2.2.5 HeLa 细胞靶向摄取效率研究 取无 FA RPMI 1640 培养基培养的单层贴壁 HeLa 细胞, 加 1 mL 胰蛋白酶消化收集细胞, 将细胞分装入 1.5 mL Eppendorf 管中, 离心弃上清, 加 0.6 mL 无 FA 的 RPMI 1640 培养基重悬细胞, 每个 EP 管中分别加入 PBS (空白对照)、15 μmol/L Calcein-L (非靶向脂质体)、15 μmol/L F-Calcein-L (靶向脂质体)、FR 阻断组 (含 15 μmol/L F-Calcein-L, 加 1 mmol/L FA), 再于 37 °C 继续孵育 1 h; 最后, 取细胞用 1 mL 冷 PBS 洗 3 遍, 分别用荧光共聚焦倒置显微镜和流式细胞仪进行定性及定量的细胞摄取效率分析。

HeLa 细胞摄取的荧光显微镜分析结果如图 5 所示, 相对于其他组别, 靶向脂质体在 HeLa 细胞中的摄取效率显著高于其他组, 细胞内有明显的钙黄绿素绿色荧光显示。而 PBS 空白对照组及普通脂质体组则呈黑色, 几乎无荧光显示, 说明普通脂质体无法穿透 HeLa 细胞进入细胞内; 阻断组的荧光较靶向脂质体为弱, 因为有 1 mmol/L 的 FA 对 HeLa 细胞表面的叶酸受体 (FR) 进行封闭, 至使脂质体无法有效与 FR 结合实现脂质体的跨膜转运。

从流式细胞术的定量分析结果 (图 6), 可以准确判断各组的荧光强度值, 空白对照组、普通脂质体、靶向脂质体及阻断组的荧光强度值分别为 2.68、17.76、328.22、36.28, 靶向脂质体的荧光强度值约为普通脂质体的 20 倍, 说明靶向脂质体能高效地进入 HeLa 细胞内, 被肿瘤细胞所摄取。

2.3 靶向 UA 脂质体的体外抗癌活性研究

取对数生长期的 HeLa 细胞以 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔酶标板中, 分 4 组, 每组设 6 个复孔。每孔加入 100 μL 的细胞培养液, 在 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中孵育 24 h; 随后分别加入除菌的空白靶向脂质体、普通脂质体、UA 靶向脂质体和阻断组药物 (除空白靶向脂质体外, 其余组均含 200 μmol/L UA), 继续培养 48、72 h; 结束后, 每孔加

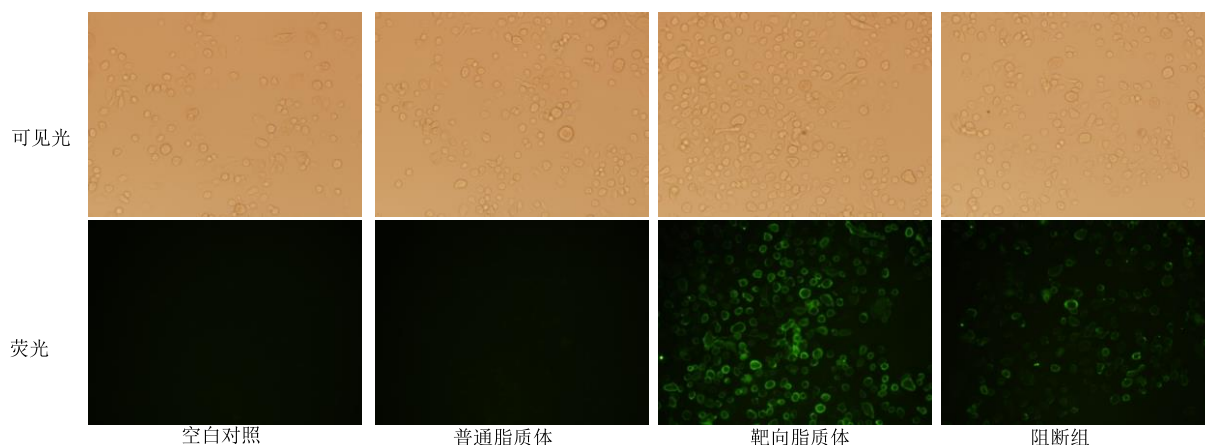


图 5 钙黄绿素脂质体与 HeLa 细胞 37 °C 共培养的荧光与可见光图片 (× 20 倍)

Fig. 5 Fluorescent and visible light images of calcein liposomes and co-culture with HeLa cells at 37 °C (× 20)

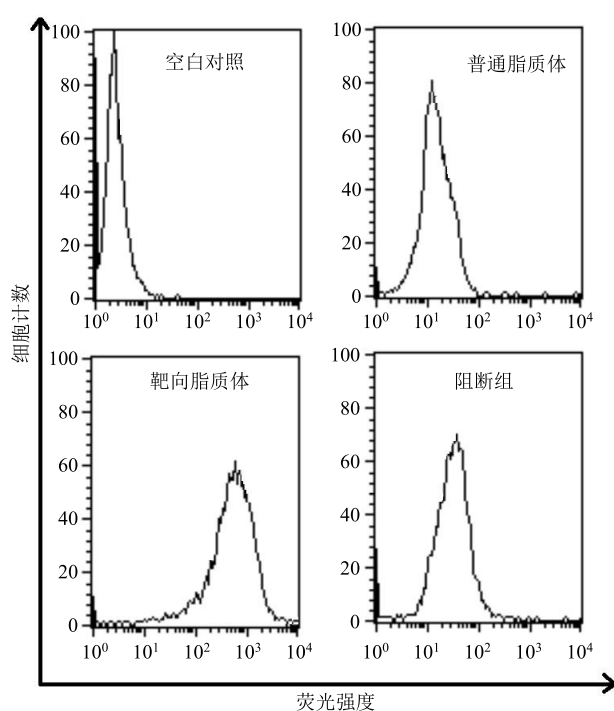


图 6 流式细胞术定量分析图谱

Fig. 6 Quantitative analysis of flow cytometry

入 20 μ L 质量浓度约 5 mg/mL 的 MTT, 于 37 °C 继续孵育 4 h; 弃原液, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 用手轻轻震荡酶标板至每孔中的蓝紫色结晶完全溶解, 并静置 20 min; 在 490 nm 条件下用酶标仪分析检测吸光度值, 计算细胞存活率。

细胞增殖抑制实验结果如图 7 所示, 随着药物作用时间的延长, UA 靶向脂质体呈现出明显的细胞抑制作用, 72 h 细胞增殖抑制效率高达 73.4%, 抑制率约为普通脂质体的 3.5 倍; 而空白靶向脂质体及普通脂质体对 HeLa 细胞的增殖几乎无抑制作用; 阻断组则有一定的增殖抑制作用, 但因为 1

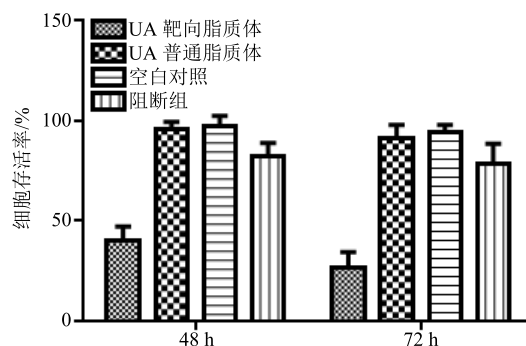


图 7 UA 靶向脂质体对 HeLa 细胞的生长抑制作用

Fig. 7 Growth inhibitory effect of UA targeting liposome on HeLa cells

mmol/L FA 对 HeLa 细胞表面 FA 受体的封闭作用, 其细胞抑制效率没有靶向脂质体显著。各组药物对细胞增殖抑制作用的顺序为 UA 靶向脂质体 > 阻断组 > UA 普通脂质体 > 空白靶向脂质体。

3 讨论

利用配体-受体特异性结合的特性, 如某些肿瘤细胞表面高表达 FA 受体和 FA 衍生物具有特异性的亲和力, 通过 FA 受体所介导的肿瘤高效靶向作用, 将具备抗癌作用的 UA 成功输送至肿瘤细胞。以 FA 为靶向分子, 将其与 CONH-PEG-NH-CHOL 通过化学合成进行连接, 合成了一种新型的肿瘤靶向材料 FA-CONH-PEG-NH-CHOL, 并用飞行时间质谱法验证其结构的正确性。同时, 以钙黄绿素作为荧光标记物制备钙黄绿素脂质体, 用荧光显微镜及流式细胞术分别定性及定量检测了靶向功能性材料成功将药物输送至肿瘤细胞内。

有研究人员通过 FA 与 PEG 末端的共价结合, 合成了 FA PEG 大分子复合物叶酸-聚乙二醇-胆固醇半琥珀酸酯 (FA-PEG-DSPE), 将其与 DSPC 和

CHOL 一起制备了靶向的阿霉素脂质体,发现 KB 口腔肿瘤细胞对该靶向脂质体的摄取效率是非靶向脂质体的 45 倍,细胞毒作用为非靶向脂质体的 86 倍^[17]。此后,又有研究人员合成了亲脂性的叶酸衍生物叶酸-聚乙二醇-胆固醇(FA-PEG-CHOL)和叶酸-聚乙二醇-胆固醇的半琥珀酸盐(FA-PEG-CHEMS),它们提高了脂质体的稳定性及肿瘤靶向性^[18-20]。然而,FA-PEG-CHOL 和 FA-PEG-CHEMS 的共同缺陷在于它们的分子结构与 PEG 侧链相连的胆固醇结构部分有酰胺键和酯键,比较容易水解。而本课题组合成的新型靶向材料 FA-CONH-PEG-NH-CHOL 分子结构中的胆固醇结构部分与 PEG 侧链的连接是通过 C-N 键,取代了原来的酰胺键;并且其胆固醇侧链均为稳定的六元环、五元环共轭结构,在水溶液中非常稳定。它还具备良好的理化性质、生物学特性、稳定性及成本低廉等优势。

在本研究中,运用脂质材料与新型的靶向功能性材料,制备了靶向 UA 脂质体。与普通脂质体相比,靶向材料能够显著提高宫颈癌 HeLa 细胞对药物的摄取量,其原因可能是由于靶向脂质体借助靶向功能性材料 FA-CONH-PEG-NH-CHOL 与 HeLa 细胞表面上过度表达的 FA 受体发生亲和力极高的特异性结合从而介导靶向性脂质体的细胞内跨膜转运,通过内吞作用进入肿瘤细胞内。通过在靶向脂质体内加入 1 mmol/L 的 FA 制备靶向阻断脂质体进行对照实验,已证实游离的 FA 可对 HeLa 细胞表面的 FA 受体进行封闭,从而阻断了靶向脂质体上 FA 臂与 FA 受体的有效结合,所以阻断组的肿瘤细胞摄取效率及肿瘤细胞增殖抑制率均没有靶向脂质体高,实验结果与之前的假设与推断完全一致。靶向 UA 脂质体能显著提高 UA 的抗肿瘤活性,说明本研究构建的靶向脂质体能够提高 UA 的抗宫颈癌活性。

参考文献

- [1] 张明发,沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的抗炎及其抗变态反应 [J]. 抗感染药学, 2011, 8(4): 235-240.
- [2] 张明发,沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸的血管药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(10): 1510-1519.
- [3] 张明发,沈雅琴. 熊果酸降血糖药理作用及其机制的研究进展 [J]. 抗感染药学, 2016, 13(1): 8-12.
- [4] 张明发,沈雅琴. 熊果酸抗糖尿病并发病的药理作用研究进展 [J]. 抗感染药学, 2016, 13(2): 247-251.
- [5] 张明发,沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸调血脂抗肥胖药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(1): 90-97.
- [6] 张明发,沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸抗肝脂肪变和纤维化作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(2): 270-278.
- [7] 张明发,沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸抗动脉粥样硬化作用 [J]. 上海医药, 2014, 35(23): 73-80.
- [8] 张明发,沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的神经精神药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(5): 570-576.
- [9] 司福亭,李靖靖,曾超,等. 熊果酸的抗肿瘤活性及作用机理研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2010, 27(1): 9-11.
- [10] 张新华,朱萱. 熊果酸药理学的最新研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(9): 1245-1289.
- [11] 张乃浩. 熊果酸包合物的研制及其在家兔体内生物等效性评价 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [12] 邱琳,赵修华,祖元刚,等. 熊果酸纳米粒的乳化溶剂蒸发制备工艺、表征及溶出特征 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2387-2393.
- [13] Cerga O, Borcan F, Ambrus R, et al. Syntheses of new cyclodextrin complexes with oleanolic and ursolic acids [J]. *J Agroaliment Proc Technol*, 2011, 17(4): 405-409.
- [14] 张文娟,陈一桢,唐兰如,等. 二氢杨梅素长循环纳米脂质体的制备及大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 806-813.
- [15] 高金芝,焦安妮,于敏,等. 人参皂苷 Re 冻干脂质体的制备及贮存稳定性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 330-336.
- [16] Guo Y, Shen L X, Lu Y F, et al. Preparation of rutin- liposome drug delivery systems and evaluation on their *in vitro* antioxidant activity [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(4): 371-375.
- [17] Lee R J, Low P S. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome entrapped doxorubicin *in vitro* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1233(2): 134-144.
- [18] Gabizon A, Horowitz A T, Goren D, et al. Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: *In vitro* studies [J]. *Bioconjug Chem*, 1999, 10(2): 289-298.
- [19] Xiang G, Wu J, Lu Y, et al. Synthesis and evaluation of a novel ligand for folate-mediated targeting liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2008, 356(1/2): 29-36.
- [20] Liu Y, Xu S, Teng L, et al. Synthesis and evaluation of a novel lipophilic folate receptor targeting ligand [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(5): 1521-1525.