

天然活性化合物奥科呋喃纳米脂质体抗肿瘤作用研究

范丹¹, 贺小琼^{1*}, 李仁秋², 姚乾³, 吴怡⁴, 尤雨桐¹, 连文静¹

1. 昆明医科大学公共卫生学院, 云南 昆明 650500

2. 昆明市儿童医院药学部, 云南 昆明 650500

3. 昆明医科大学第三附属医院, 云南省肿瘤研究所, 云南 昆明 650031

4. 昆明医科大学 科研实验中心, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 研究天然活性化合物奥科呋喃 [C₁₈H₁₇NO₆, 6-乙酰基-2-(1-氨基-亚乙基)-7,9-二羟基-8,9b-二甲基-9bH-二苯呋喃-1,3-二酮] 纳米脂质体的体外和体内抗肿瘤作用。方法 采用薄膜分散-超声法制备纳米脂质体, 采用 HPLC 法测定纳米脂质体载药量。体外培养人肝癌 HepG2 细胞、人结肠癌 HCT-116 细胞、云南宣威肺癌 XWLC-05 细胞, 采用 MTT 法评价纳米脂质体体外抗癌作用。制备 HCT-116 裸鼠移植瘤模型, 观察载药纳米脂质体体内对裸鼠移植肿瘤的生长抑制作用。

结果 载药纳米脂质体的载药量为 1.26 mg/mL。载药纳米脂质体对 XWLC-05、HCT-116、HepG2 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 2.48、0.86、1.86 μg/mL, 且在 4 μg/mL 时对 XWLC-05、HCT-116、HepG2 细胞的增殖抑制率分别为 85.59%、99.95%、96.91% ($P < 0.01$)。裸鼠肿瘤相对增殖率最小为 50.98%, 具有体内抗肿瘤作用。**结论** 天然活性化合物奥科呋喃可制备为纳米脂质体; 体外细胞实验表明, 奥科呋喃纳米脂质体对癌细胞作用呈明显的剂量-效应关系; 裸鼠体内实验发现, 载药纳米脂质体对裸鼠移植瘤的生长有抑制作用。

关键词: 奥科呋喃; 纳米脂质体; 天然活性产物; 抗肿瘤活性; 6-乙酰基-2-(1-氨基-亚乙基)-7,9-二羟基-8,9b-二甲基-9bH-二苯呋喃-1,3-二酮

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)07-1636-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.021

Preparation and anticancer effect of natural active compound usenamine nano-liposomes

FAN Dan¹, HE Xiao-qiong¹, LI Ren-qiu², YAO Qian³, WU Yi⁴, YOU Yu-tong¹, LIAN Wen-jing¹

1. School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

2. Pharmacy Department, Kunming Children's Hospital, Kunming 650500, China

3. Yunnan Tumor Institute, The Third Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650031, China

4. Experiment Center for Medical Science Research, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To study the antitumor effect of natural active compound usenamine (C₁₈H₁₇NO₆, 6-acetyl-2-(1-amino-ethylidene)-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-9bH-dibenzofuran-1,3-dione) nano-liposomes *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Nano-liposomes were prepared by thin film dispersion-ultrasonic method. The drug loading of nano-liposomes was determined by HPLC. The cancer cells were cultured *in vitro*, and the absorbance values were measured by MTT method to evaluate the anticancer effect *in vitro*. A nude mouse xenograft model was established to observe the growth inhibitory effect of drug-loaded nano-liposomes on tumor growth in nude mice. **Results** The drug loading of drug-loaded nano-liposomes was 1.26 mg/mL. The IC₅₀ of the drug-loaded nano-liposomes in the XWLC-05, HCT-116, and HepG2 cells were 2.48 μg/mL, 0.86 μg/mL, and 1.86 μg/mL, respectively, and the inhibition rates of XWLC-05, HCT-116, and HepG2 cells administered at a dose of 4 μg/mL were 85.59%, 99.95%, and 96.91%, respectively ($P < 0.01$). The minimum relative tumor proliferation rate of nude mice was 50.98%, and usenamine nano-liposomes had antitumor effect *in vivo*. **Conclusion** The natural active compound usenamine can be prepared as a nano-liposome.

收稿日期: 2018-10-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760538); 云南省科技厅科技计划项目 (2018FE001); 昆明医科大学重大成果培育项目 (CGPY201603)

作者简介: 范丹 (1991—), 女, 研究生在读, 从事天然产物活性成分与抗肿瘤药物研发。Tel: 18083867400 E-mail: 1042831373@qq.com

***通信作者** 贺小琼, 男, 教授, 硕士生导师, 从事天然产物活性成分与抗肿瘤药物研发。Tel: 13759589108 E-mail: hexqen@aliyun.com

In vitro cell experiments showed that usenamine nano-liposomes had a dose-effect relationship with cancer cells. *In vivo* experiments in nude mice found that drug-loaded nano-liposomes had inhibitory effect on tumors.

Key words: usenamine; nano-liposomes; natural active products; anti-cancer activity; 6-acetyl-2-(1-amino-ethylidene)-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-9bH-dibenzofuran-1,3-dione

近年来,癌症已经成为严重威胁人类健康及社会发展的公共卫生问题^[1],其中肺癌是最常见的诊断癌症,占癌症总死亡人数的 18.4%,其次是女性乳腺癌(11.6%)、前列腺癌(7.1%)和结肠癌(6.1%)^[2]。与此同时,癌症病人承受着巨大的心理压力和经济负担。据统计,2015 年我国居民癌症经济负担已达 2 214 亿元^[3-4]。天然资源中存在很多具有防癌、抗癌作用的活性物质,且其有毒副作用小、靶向性强等优点^[5],从天然生物资源中寻找抗癌活性化合物,是抗癌药物研发的一个重要途径^[6-7]。

经本课题组前期研究证实,松萝 *Usneae Filum* 提取物(antimutagen-He, AMH)对多种常见高活性致癌、致突变物如苯并(a)芘(BaP)、黄曲霉毒素 B1 (AFB1)、环磷酰胺(CP)等有较强的抑制突变作用,且具有抑制动物体内移植瘤生长和体外人癌细胞株增殖的作用^[8-11]。本课题组对 AMH 中功效化合物进行分离,得到化学名为 6-乙酰基-2-(1-氨基-亚乙基)-7,9-二羟基-8,9b-二甲基-9bH-二苯呋喃-1,3-二酮 [6-acetyl-2-(1-amino-ethylidene)-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-9bH-dibenzofuran-1,3-dione] 的化合物,其分子式为 $C_{18}H_{17}NO_6$, 相对分子质量为 343,中文俗名为奥科呋喃。奥科呋喃为首次在松萝中提取出的一种抗癌作用较强的新物质,经研究发现,该化合物抗癌作用显著强于顺铂,优于紫杉醇^[12]。实验过程中发现奥科呋喃水溶性较差,影响疗效发挥。纳米脂质体已广泛应用于改善传统的癌症治疗策略^[13]。脂质体在药物传递系统中发挥了很大的作用,可以显著提高药物的治疗指数,减少药物毒性,提高药物生物利用度^[14-16]。本实验将奥科呋喃制成纳米脂质体,研究奥科呋喃纳米脂质体在体内和体外的抗肿瘤作用,比较不同癌细胞对奥科呋喃纳米脂质体的敏感性差异,观察奥科呋喃纳米脂质体在免疫功能缺陷的实验动物体内的抗肿瘤活性,为抗肿瘤新药开发提供参考。

1 材料

1.1 人癌细胞株

人肝癌 HepG2 细胞、人结肠癌 HCT-116 细胞、云南宣威肺癌 XWLC-05 细胞均由云南省肿瘤医院提供。

1.2 药物与试剂

奥科呋喃由实验室合成,质量分数为 99.8%;大豆磷脂(上海麦克林生化科技有限公司);胆固醇(上海金穗生物科技有限公司);DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清等均购买于 HyClone 公司;顺铂购于齐鲁制药有限公司,批号 H20073652。

1.3 实验动物

Balb/c 裸鼠(30 只),SPF 级,体质量 18~20 g,35~55 日龄,雄性,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2016-0006,饲养于昆明医科大学 SPF 清洁实验中心。

1.4 仪器

旋转蒸发仪、SONICS&MATERIALS 超声波破碎仪、Thermo Forma Series II 二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Thermo Multiskan Spectrum 酶标仪(Thermo Fisher 公司);超净工作台(上海博迅实业有限公司);超低温冰箱 Forma995 (Thermo 电子有限公司)。

2 方法

2.1 薄膜分散-超声法制备奥科呋喃纳米脂质体

精密称取 0.12 g 奥科呋喃、3.6 g 大豆磷脂、0.72 g 胆固醇置于圆底烧瓶中,加入 20 mL 分析纯醋酸乙酯,震荡搅拌使固体充分溶解,于 70 °C 旋转蒸发去除醋酸乙酯,使其形成均匀薄膜层,彻底吹干瓶内剩余气体,加入同温度下 40 mL PBS 充分洗膜,普通超声 1 h 使薄膜层与水相充分混合,冰浴下使用超声波破碎仪分散,5 min/次,共 3 次。先采用 450 nm 微孔滤膜进行初滤过,再使用 220 nm 微孔滤膜进行除菌滤过,得奥科呋喃纳米脂质体混悬液(粒径小于 220 nm),4 °C 冷藏备用。

2.2 HPLC 法测定奥科呋喃纳米脂质体载药量^[17]

使用色谱柱 Amethyst C_{18} -H(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),以甲醇-水(85:15)为流动相,检测波长 290 nm、体积流量 0.8 mL/min,柱温 30 °C,进样量 20 μ L。取奥科呋喃纳米脂质体混悬液 1 mL,加入甲醇定容至 10 mL,超声 30 min 破坏纳米脂质体,滤过,取 1 mL 滤液进样,测定脂质纳米粒的载药

量。测得载药量为 1.26 mg/mL。

2.3 MTT 法检测奥科呋喃纳米脂质体体外抗肿瘤作用

收集对数生长期各肿瘤细胞,进行细胞计数,用完全培养液(DMEM/F12 培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素)调整细胞浓度,分别接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后细胞贴壁取出培养板,加入含有不同质量浓度(0.5、1、2、3、4 μ g/mL)的奥科呋喃纳米脂质体完全培养液。同时设置空白对照组(无细胞)、溶剂对照(PBS)组、顺铂(2 μ g/mL)组。再放置于细胞培养箱中培养 72 h 后,吸出培养液,每孔加入含 10% MTT (5 mg/mL) 的完全培养液 200 μ L,继续培养 4 h 后,弃培养液,每孔加入 150 μ L 的 DMSO,避光轻轻震荡 10 min,在 490 nm 波长的条件下用酶标仪检测吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率,再使用 SPSS 19.0 计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{溶剂对照}} - A_{\text{药物}}) / (A_{\text{溶剂对照}} - A_{\text{空白对照}})$$

2.4 奥科呋喃纳米脂质体体内对裸鼠移植瘤的影响

收集对数生长期 HCT-116 细胞,使用无胎牛血清细胞培养液调整细胞浓度至 1×10^8 个/mL,每只裸鼠接种 0.1 mL 细胞液于右侧背部皮下,观察裸鼠肿瘤生长情况,肿瘤体积约为 200 mm³ 时,将 30 只符合条件的裸鼠按肿瘤体积进行分层,然后随机抽样分为对照组(PBS)、顺铂组(3 mg/kg)和奥科呋喃纳米脂质体(简称奥科呋喃)低、中、高剂量(12、24、48 mg/kg)组,每组 6 只荷瘤小鼠。分组当日开始 ip 给药,隔 1 d 给药 1 次,给药体积均为 30 mL/kg,共给药 10 次,每 4 天测量 1 次肿瘤的长径(a)、短径(b)以及裸鼠体重。末次给药次日脱颈处死,测量肿瘤体积和裸鼠体重后,完整地剥离肝脏、脾脏、肾脏、睾丸,称其质量,分别计算肿瘤体积(V)、相对肿瘤体积(RTV)、

肿瘤相对增殖率(RPR)、脏器系数。

$$V = a \times b^2 / 2$$

$$\text{RTV} = V_t / V_0$$

$$\text{RPR} = \text{TrTV} / \text{CrTV}$$

$$\text{脏器系数} = \text{脏器质量} / \text{体质量}$$

V_t 是实验中每次测量的 V , V_0 是分组时的 V ; TrTV 是实验组的 RTV, CrTV 是对照组的 RTV

2.5 统计学分析

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 软件进行分析,细胞实验采用方差分析、 t 检验和直线回归分析,动物实验采用重复测量方差分析。

3 结果与分析

3.1 奥科呋喃纳米脂质体体外抗肿瘤作用

奥科呋喃纳米脂质体在不同质量浓度(0.5、1、2、3、4 μ g/mL)下对 XWLC-05、HCT-116、HepG2 细胞作用 72 h 的增殖抑制率结果见表 1。顺铂对 XWLC-05、HCT-116、HepG2 细胞的增殖抑制率分别为 45.10%、57.84%、81.40%,显著抑制 3 种细胞的增殖($P < 0.01$);与溶剂对照组比较,奥科呋喃纳米脂质体 5 种质量浓度下均显著抑制 HCT-116 细胞与 HepG2 细胞的增殖($P < 0.01$),对 XWLC-05 细胞奥科呋喃纳米脂质体在质量浓度为 2、3、4 μ g/mL 时显著抑制细胞的增殖。通过 SPSS 直线回归分析得出奥科呋喃纳米脂质体对 XWLC-05、HCT-116、HepG2 细胞的 IC₅₀ 分别为 2.48、0.86、1.86 μ g/mL。且在 4 μ g/mL 时,奥科呋喃纳米脂质体对 XWLC-05、HCT-116、HepG2 细胞的增殖抑制率分别为 85.59%、99.95%、96.91% ($P < 0.01$)。因此,表明奥科呋喃纳米脂质体对多种肿瘤细胞具有增殖抑制作用,抑制率随载药纳米脂质体的质量浓度增加而升高,存在量效关系,且不同肿瘤细胞对奥科呋喃纳米脂质体的敏感性不同,其中 HCT-116 细胞最为敏感。

表 1 奥科呋喃纳米脂质体对不同的人癌细胞株的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Inhibitory effects of usenamine nano-liposomes on different human cancer cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	XWLC-05		HCT-116		HepG2	
		A 值	增殖抑制率/%	A 值	增殖抑制率/%	A 值	增殖抑制率/%
溶剂对照	—	0.440 $\pm$ 0.036	—	2.134 $\pm$ 0.154	—	0.910 $\pm$ 0.099	—
顺铂	2	0.241 $\pm$ 0.026**	45.10	0.596 $\pm$ 0.040**	57.84	0.104 $\pm$ 0.020**	81.40
奥科呋喃纳米脂质体	0.5	0.451 $\pm$ 0.021	-2.49	1.040 $\pm$ 0.156**	51.28	0.824 $\pm$ 0.084**	30.87
	1	0.435 $\pm$ 0.010	1.04	0.568 $\pm$ 0.078**	73.38	0.809 $\pm$ 0.096**	32.18
	2	0.317 $\pm$ 0.008**	27.78	0.212 $\pm$ 0.016**	90.09	0.640 $\pm$ 0.089**	46.32
	3	0.096 $\pm$ 0.011**	78.12	0.037 $\pm$ 0.010**	98.28	0.258 $\pm$ 0.032**	78.34
	4	0.063 $\pm$ 0.003**	85.59	0.001 $\pm$ 0.002**	99.95	0.037 $\pm$ 0.005**	96.91

与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 奥科呋喃纳米脂质体对体内 HCT-116 移植瘤生长抑制作用

3.2.1 对荷瘤裸鼠肿瘤生长速度的影响 不同剂量奥科呋喃纳米脂质体组在不同时间点裸鼠的 RTV 结果见图 1, 可以看出, 奥科呋喃纳米脂质体组裸鼠各时间点的 RTV 较对照组显著降低 ($P < 0.01$), 且 3 组的趋势大致相同, 说明奥科呋喃纳米脂质体体内能够抑制 HCT-116 移植瘤的生长。

3.2.2 对荷瘤裸鼠 RPR 的影响 实验第 4、8、12、16、20 天, 各组裸鼠 RPR 结果见图 2, 奥科呋喃

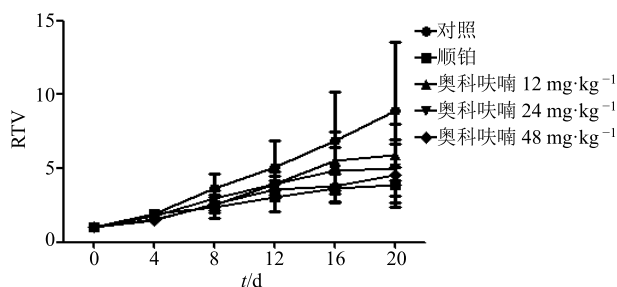


图 1 各组裸鼠移植瘤 RTV 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Relative tumor volume changes of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

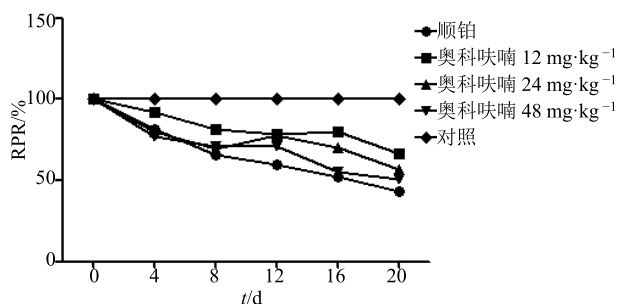


图 2 各组裸鼠的 RPR

Fig. 2 Relative proliferation rate of tumor in nude mice in each group

米脂质体各组裸鼠的 RPR 均低于对照组, 且随着剂量的增加和给药时间的延长逐渐降低, 其中高剂量组最低 RPR 达到 50.98%。根据抗癌药物体内实验活性判断标准, 本实验的最低 RPR 小于 60%, 表明奥科呋喃纳米脂质体具有体内抗肿瘤作用, 其中高剂量组的 RPR 普遍低于低剂量组 ($P < 0.05$)。

3.3 对荷瘤裸鼠的一般毒性观察

整个实验过程中, 各组荷瘤小鼠的体质量均有下降, 由图 3 可见, 对照组和奥科呋喃纳米脂质体各组随给药次数的增加体质量下降趋势相近, 且体质量相对下降缓慢, 顺铂组体质量下降趋势较大, 可能与顺铂对小鼠机体产生的毒副作用有关。

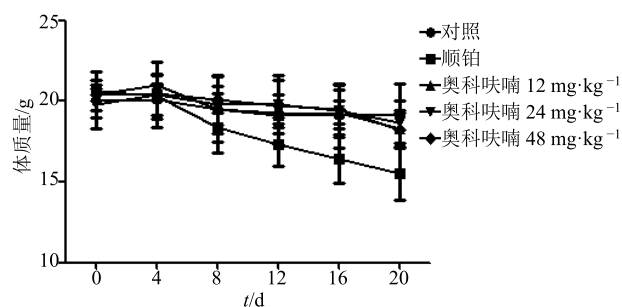


图 3 不同时间点各组小鼠平均体质量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Average body weight of mice in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4 对荷瘤裸鼠脏器系数的影响

奥科呋喃纳米脂质体各组荷瘤裸鼠脾脏、肾脏、睾丸的脏器系数与对照组比较, 差异不显著 ($P > 0.05$), 奥科呋喃纳米脂质体高剂量组与对照组比较肝脏系数显著增加 ($P < 0.05$)。表明奥科呋喃纳米脂质体高剂量给药对裸鼠肝脏发育有一定的影响, 但对其他脏器发育无明显毒性。脏器系数结果见表 2。

表 2 裸鼠主要脏器系数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Comparison of major organ coefficients in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	脏器系数			
		肝脏	脾脏	肾脏	睾丸
对照	—	5.28 ± 0.99	0.84 ± 0.99	1.59 ± 0.10	0.84 ± 0.07
顺铂	3	5.75 ± 0.21	0.22 ± 0.03*	1.64 ± 0.09	0.56 ± 0.06
奥科呋喃纳米脂质体	12	6.09 ± 0.61	1.11 ± 0.17	1.77 ± 0.27	0.89 ± 0.07
	24	6.11 ± 0.38	1.10 ± 0.33	2.02 ± 0.30	0.87 ± 0.05
	48	7.26 ± 0.26*	1.23 ± 0.07	1.92 ± 0.27	0.91 ± 0.11

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

4 讨论

纳米脂质体的制备方法主要包括薄膜分散法、逆向蒸发法、二次乳化法、超声波分散法以及多种方法联合^[18]。本研究采用薄膜分散-超声法,此方法制备脂质体粒径较小且操作简易、稳定性好、对静脉刺激小及有一定的长效作用,适合脂溶性及水溶性极低的药物^[19-20]。奥科呋喃化合物是具有较强的抗癌作用和抑制肿瘤细胞生长作用的天然产物,毒性低、治疗效果好,但在水中极难溶解,因此,将其制备为纳米脂质体解决其制剂应用问题。

本研究在奥科呋喃纳米脂质体的体外细胞实验中,使用3种不同癌细胞进行比较,发现不同癌细胞株对奥科呋喃纳米脂质体的敏感度不同,其中HCT-116细胞最为敏感,IC₅₀为0.86 μg/mL,且随着给药质量浓度的增加,肿瘤细胞增殖抑制率均呈现升高趋势,有明显的剂量-效应关系。载药纳米脂质体4 μg/mL时对细胞的最大增殖抑制率为99.95%。说明奥科呋喃纳米脂质体在治疗癌症方面有较好的前景,同时为新药开发奠定了基础。

通过裸鼠体内实验发现,奥科呋喃纳米脂质体对肿瘤生长有抑制作用。随给药次数的增加,裸鼠RPR减小,具有明显的时间-效应关系。且制备纳米脂质体的材料无毒、无害,裸鼠未出现生理异常,同时还提高了动物的生活质量。有资料指出^[21],脂质体剂型能大幅度降低化疗药物的毒副作用,尤其是对心肌的损害,是近些年来人们广泛研究开发的新剂型。

综上所述,本研究证实,奥科呋喃能够制备成纳米脂质体。具有明显的体内和体外抗肿瘤作用,能够有效地抑制肿瘤生长,下一步将对奥科呋喃纳米脂质体进行毒理学安全性评价,探讨其是否具有毒性作用。

志谢:昆明医科大学科研实验中心、云南省肿瘤研究所。

参考文献

- [1] 陈万青,李贺.人群肿瘤监测在癌症防控中的作用[J].肿瘤预防与治疗,2018,31(1):1-4.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [3] Cai Y, Xue M, Chen W, et al. Expenditure of hospital care on cancer in China, from 2011 to 2015 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2017, 29(3): 253-262.
- [4] 胡建平,饶克勤,钱军程,等.中国慢性非传染性疾病

- 经济负担研究[J].中国慢性病预防与控制,2007,15(3):189.
- [5] Gai R Y, Xu H L, Qu X J, et al. Dynamic of modernizing traditional Chinese medicine and the standards system for its development [J]. *Drug Discov Ther*, 2008, 2(1): 2-4.
- [6] H X Q, Duan J L, Zhou J, et al. Effects of two traditional Chinese cooking oils, canola and pork, on pH and cholic acid content of faeces and colon tumorigenesis in kunming mice [J]. *Asian Pacific J Cancer Prevent*, 2015, 16(15): 6225-6229.
- [7] 税靖霖,贺小琼,姜重阳,等.赤星衣酸甲酯的抗癌作用及机制研究[J].中草药,2017,48(12):2474-2480.
- [8] He X Q, Hu Y, Winter J, et al. Anti-mutagenic lichen extract has double-edged effect on azoxymethane-induced colorectal oncogenesis in C57BL/6J mice [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2010, 20(1): 31-35.
- [9] He X Q. The inhibitory effects of natural plant extract AMH on the mutagenicity of several carcinogens *in vitro* [J]. *Chin J Lymphol Oncol*, 2004, 3(2): 105-107.
- [10] 贺小琼.天然植物制剂AMH体外抑制多种强致癌物的致突变作用[J].肿瘤,2003,23(6):494-496.
- [11] 贺小琼,李凝诗,李凤,等.真菌提取物AMH的肿瘤化学预防活性组分追踪[J].癌变·畸变·突变,2011,23(3):166-170.
- [12] 贺小琼.二羟二苯并[b,f][1,5]二氧杂辛环类化合物制备方法及其药用组合物和应用:中国,201811420247.3[P].2018-11-27.
- [13] 李可欣,常莎莎,邸东华,等.配体介导的纳米脂质体作为肿瘤疫苗载体的可行性评价[J].沈阳药科大学学报,2017,34(1):23-27.
- [14] Tardi P, Choice E, Masin D, et al. Liposomal encapsulation of topotecan enhances anticancer efficacy in murine and human xenograft models [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(13): 3389-3393.
- [15] Torchilin V P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(2): 145-160.
- [16] 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.
- [17] 罗小燕,吕竹芬,陈燕忠,等.薄膜-超声法制备芦丁固体脂质纳米粒的研究[J].西北药学杂志,2015,30(3):267-270.
- [18] 高惠静,安惠霞,陈蓓,等.与纳米脂质体制备方法相关的中国发明专利[J].中国药房,2016,27(7):976-977.
- [19] 郭倩倩.紫杉醇纳米脂质体的研究进展[J].中国药科大学学报,2014,45(5):599-606.
- [20] Wang S J, Hou W, Sun K, et al. Effects of several auxiliary materials on the particle size and Zeta potential of paclitaxel liposome [J]. *Med Plant*, 2011, 2(10): 52-55.
- [21] 龚连生,曾雅娟,张阳德,等.阿霉素纳米脂质体的生物学效应研究[J].中国现代医学杂志,2009,19(24):3760-3762.