

• 药剂与工艺 •

用于眼部给药的槲皮素与 microRNA-150 共载阳离子固体脂质纳米粒制备及初步评价

陈 梁^{1,2}, 李 维², 唐 琦³, 王 迪¹, 邱海燕⁴, 陈加容⁵, 章津铭^{1*}, 邹 亮^{2,4*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137
2. 成都大学医学院, 四川 成都 610106
3. 成都大学 四川抗菌素工业研究所, 四川 成都 610052
4. 成都大学 农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川 成都 610106
5. 成都大学附属医院 药剂科, 四川 成都 610081

摘 要: 目的 制备槲皮素与 microRNA-150 (mR150) 共载阳离子固体脂质纳米粒 (Que/mR150 SLNs), 考察其制备工艺, 并评价其体外释放、细胞摄取能力以及眼部给药安全性。方法 采用薄膜分散法制备包载槲皮素的阳离子固体脂质纳米粒 (Que-SLNs), 以平均粒径、多分散指数 (PDI)、包封率为指标, 优化其制备工艺; 采用静电吸附法将 mR150 共载于纳米粒中, 制备 Que/mR150 SLNs, 通过琼脂糖凝胶电泳实验考察纳米粒对 miRNA 的吸附效率; 并考察 Que/mR150 SLNs 中槲皮素的体外释药性能; 采用 MTT 法测定 Que/mR150 SLNs 对人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC 增殖的影响, 并对其进行荧光标记, 观察其在 HUVEC 细胞中的摄取情况; 并通过兔眼病理组织切片考察 Que/mR150 SLNs 对兔眼的刺激性。结果 经过工艺优化, 制得的阳离子纳米 Que-SLNs 载药性、粒径分布、稳定性均较好, 其外观呈类球形, 放置 2 个月能保持稳定, 槲皮素包封率为 (85.25±1.29) %, 载药量 (1.67±0.02) %, 平均粒径 (110.00±2.10) nm, Zeta 电位 (53.20±5.12) mV; 体外药物释放结果表明, 槲皮素在纳米粒中释放较缓慢, 48 h 内累积释放量约 (80.69±1.29) %; 在不同阳离子材料双十八烷基二甲基溴化铵与 mR150 的质量比 (DDAB/RNA) 为 6:1 时, 阳离子固体脂质纳米粒可基本将 mR150 包载完全, 且对其粒径、电位影响较小; MTT 实验表明, 50~150 mg/L 的空白纳米质量浓度对 HUVEC 细胞无明显增殖毒性; 细胞摄取实验表明, Cy5 与香豆素 6 (coumarin-6, C6) 双荧光标记共载纳米能有效进入 HUVEC 细胞; 兔眼病理组织切片显示 Que/mR150 SLNs 多次给药对眼部角膜组织无明显损伤。结论 Que/mR150 SLNs 固体脂质纳米粒制备工艺稳定可靠、重复性好、贮藏稳定性、生物安全性好, 有利于高效递送槲皮素与 mR150 进入 HUVEC 细胞, 为年龄相关性黄斑变性等血管增生相关疾病的治疗提供思路。

关键词: 槲皮素; microRNA-150; 共递送; 固体脂质纳米粒; 眼部给药; 体外释放; 细胞摄取; 安全性; 薄膜分散法; 静电吸附法; 吸附效率; MTT 法; HUVEC 细胞; 刺激性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)18-4627-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.005

Preparation and preliminary evaluation of quercetin and microRNA-150 co-loaded cationic solid lipid nanoparticles for ocular administration

CHEN Liang^{1,2}, LI Wei², TANG Qi³, WANG Di¹, QIU Hai-yan⁴, CHEN Jia-rong⁵, ZHANG Jin-ming¹, ZOU Liang^{2,4}

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. College of Medical, Chengdu University, Chengdu 610106, China

收稿日期: 2020-04-02

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究 (2019YJ0661); 四川省科技创新苗子工程 (2019061); 四川省医学科研课题计划 (S18056); 成都市卫生和计划生育委员会临床药学重点学科

作者简介: 陈 梁, 在读硕士, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究。E-mail: 1125544949@qq.com

*通信作者 章津铭, 博士, 教授, 从事中药新制剂与新剂型研究。E-mail: zhangjinming1987@126.com

邹 亮, 博士, 教授, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究。E-mail: zouliang@cdu.edu.cn

3. College of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610052, China
4. Key Laboratory of Coarse Cereal Processing of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu University, Chengdu 610106, China
5. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu 610081, China

Abstract: Objective To prepare the cationic solid lipid nanoparticles (Que/mR150 SLNs) co-loaded with quercetin (Que) and microRNA-150 (mR150) and investigate the preparation process, then assess its *in vitro* release, cell uptake capacity and safety of ocular administration. **Method** First, thin-film dispersion method was used to prepare quercetin-encapsulated cationic solid lipid nanoparticles (Que-SLNs), and the preparation process was optimized based on the particle size, PDI and encapsulation rate; Using electrostatic adsorption method to co-load mR150 in nanoparticles (Que/mR150 SLNs), and the adsorption efficiency of the miRNA by the nanoparticles was examined by agarose gel electrophoresis experiment; The *in vitro* release performance of quercetin in Que/mR150 SLNs was investigated; The effect of Que/mR150 SLNs on the proliferation of HUVEC of human umbilical vein endothelial cells was measured by MTT method, and fluorescence labeling was used to observe their uptake in HUVEC; And the irritancy of Que/mR150 SLNs to rabbit eyes was examined by pathological tissue sections of rabbit eyes. **Result** After process optimization, the cationic nano Que-SLNs had good drug-loading, particle size distribution and stability. The appearance of the cationic nano-Que-SLNs was spherical, and it could be kept stable for two months. The quercetin encapsulation rate was $(85.25 \pm 1.29)\%$, the drug load was $(1.67 \pm 0.02)\%$, the average particle size was (110.00 ± 2.10) nm, and the Zeta potential is (53.2 ± 5.12) mV; The *in vitro* drug release results showed that the release of quercetin in the nanoparticles was slow, and the cumulative release amount within 48 h was about $(80.69 \pm 1.29)\%$; When the mass ratio of dioctadecyl dimethyl ammonium bromide to mR150 (DDAB/RNA) of different cationic materials was 6 : 1, the cationic solid lipid nanoparticles basically encapsulated mR150 completely with little effect on its particle size and potential. MTT experiments showed that blank nanometer mass concentration of 50—150 mg/L had no significant proliferation toxicity on HUVEC cells; Cell uptake experiments showed that Cy5 and coumarin-6 dual fluorescently labeled and co-loaded nanometers could effectively enter HUVEC cells; Pathological tissues of rabbit eyes showed that Que/mR150 SLNs had no obvious damage to the eyes. **Conclusion** The preparation process of Que/mR150 SLNs solid lipid nanoparticles is stable and reliable, with good reproducibility, storage stability and good biological safety, which is conducive to the efficient delivery of quercetin and mR150 into HUVEC cells, which provides the ideas for the treatment of diseases related to angiogenesis

Key words: quercetin; microRNA-150; co-delivery; solid lipid nanoparticles; ocular administration; *in vitro* release; cellular uptake; safety; thin film dispersion; electrostatic adsorption; adsorption efficiency; MTT method; HUVEC cells; irritancy

眼底病是世界范围内致盲的重要原因,已经严重影响到人们的健康和生活质量。其中年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是一种渐进性眼底疾病,已成为全球中老年人不可逆失明的首要原因。AMD发病机制尚不完全清楚,目前研究表明,其与氧化应激、病理性新生血管化及慢性炎症反应密切相关,其中,视网膜(RPE)细胞氧化损伤和脉络膜新生血管化是其重要机制之一^[1-4]。采用抗血管生长因子(VEGF)药物如Avastin、康柏西普等抑制脉络膜新生血管化,是AMD临床治疗的常用策略。但长时间使用抗血管生成药物可能会产生心脑血管并发症或抑制伤口愈合,需要筛选其他用于眼底病的有效药物。同时,由于眼部吸收障碍,临床上常使用玻璃体注射给药方式让药物蓄积在视网膜、脉络膜局部^[5],但这会给患者带来极大的不便,同时还有视网膜脱落、白

内障和玻璃体出血等并发症风险^[6]。故开发用于血管增生相关的眼底病,安全有效的治疗药物和给药方式具有重要意义。

槲皮素(quercetin, Que)是一种具有多种生物学活性的多羟基黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、神经保护、眼保护、抑制脉络膜血管新生^[7-12]等药理作用。研究发现^[13-15],槲皮素能增强RPE细胞中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化氢酶、过氧化氢酶的活性,减少促炎因子IL-6、IL-8等的生成,抑制RPE细胞氧化应激损伤,从而治疗AMD。MicroRNAs(miRNAs)是一类内源性非编码RNA,通过特异性抑制靶mRNA的翻译或降解来调节参与细胞增殖、凋亡、细胞周期进程和分化过程^[16]。大量研究表明miRNAs的异常表达与AMD的发生与发展紧密相关,主要参与眼部病理性新生血管化、氧化应激以及免疫炎症反应等进程^[17-19]。

研究证明^[20,21], 在眼部血管新生模型中, 玻璃体注射 microRNA-150 (mR150) 能显著下调 CXCR4、DLL4、FZD4 等血管生成靶基因的表达, 从而抑制脉络膜血管新生。由于氧化损伤的 RPE 细胞功能障碍, 会诱导炎症细胞分泌血管生成因子, 促使血管通透性增加、血流量降低, 诱导脉络膜新生血管形成, 可引起视网膜组织的破坏, 导致瘢痕形成, 从而引起视力丧失^[22-23]。因此, 将槲皮素与 mR150 联合应用, 可发挥多靶点抗 AMD 作用, 提高疗效。但是, 由于槲皮素水溶性和脂溶性差, 生物利用度低; miRNAs 稳定性差, 难以被细胞摄取等问题, 极大地限制了它们在眼部给药的应用。

固体脂质纳米粒 (solid lipid nanoparticles, SLNs) 是近年来发展起来的新一代亚微粒给药系统, 它是以固态天然脂质如卵磷脂或合成类脂如三酰甘油等为载体, 将药物包裹或镶嵌于脂质或类脂核中, 制备成的纳米给药系统^[24-25]。在眼部给药中, 纳米给药系统有助于提高药物渗透性、控制药物释放以及实现药物靶向转运^[26]。由于眼角膜、结膜以及巩膜等组织带负电, 因此, 阳离子固体脂质纳米粒可增强其在角膜与巩膜的滞留时间, 同时也能够增强药物在角膜与巩膜的透过性^[27-29]。本实验将槲皮素与 mR150 共同包载在阳离子 SLNs 中, 实现了中药活性成分与基因药物的共递送, 并希望通过局部滴眼给药的方式, 将药物递送至眼后段发挥疗效, 为 AMD 等血管增生相关疾病的治疗提供思路。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; Research Plus 移液器, 德国 Eppendorf 公司; ZEN3600 纳米粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; SYNERGY H1 多功能酶标仪, 美国 BioTek 公司; CPA225B 电子天平, 赛多利斯天平有限公司; KMH1 超声波清洗仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅, 常州澳华仪器有限公司; RE-2000B 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; Ymnl-1000Y 超声波细胞粉碎仪, 南京以马内利仪器设备有限公司; JEM-1200EX 透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; TCS SP8 激光共聚焦显微镜, 德国 Leica 公司; 透析袋 (截留相对分子质量 14 000), 上海炎怡生物技术有限公司; CHA-S 恒温振荡器, 常州澳华仪器有限公司; 水平电泳槽, 北京君意东方电泳设备有限公司; S1 移液管电动移液器, 赛默飞世尔科技有限公司; 300 kD 超滤管,

赛多利斯科学仪器有限公司。

槲皮素对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号为 100081-201408, 质量分数 $\geq 99\%$, 槲皮素原料药, 上海麦克林生化科技有限公司, 批号为 C10376046, 质量分数 $\geq 97\%$; 大豆卵磷脂 Lipoid S100 (SPC), 德国 Lipoid 公司; 单硬脂酸甘油酯 (GMS), 上海源叶生物科技有限公司; 双十八烷基二甲基溴化铵 (DDAB), 美国 Sigma 公司; 胆固醇 (Chol), 美仑生物技术有限公司; Exgreen 核酸染料, 北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 琼脂糖, Biowest Agarose 公司; RNase free 水、mR150 mimics 和 Cy5-mR150 购于上海吉玛生物技术有限公司, 其中 mR150 mimics 序列 (5'-3') 为 UCUCCCAACCC-UUGUACCAGUG; 分析纯聚山梨酯 80 (Tween 80)、甲醇、乙醇、氯仿均购于成都科隆化学有限公司; 色谱纯甲醇购于美国 Sigma-Aldrich 公司。

人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC 由四川大学提供; 新西兰大白兔, 雄性, 体质量 2.0~2.5 kg, 由四川成都达硕实验动物有限公司提供, 动物许可证号 SCXK (川) 2018-17。

2 方法与结果

2.1 载槲皮素阳离子固体脂质纳米粒 (Que-SLNs) 的制备与表征

2.1.1 Que-SLNs 的制备 称取适量槲皮素, 取一定量 SPC、GMS、Chol、DDAB 作为混合脂质材料, 共同溶于适量氯仿与乙醇混合溶剂中, 加入茄形瓶中, 在 45 °C 下减压旋转蒸发除去有机溶剂, 得到一层脂质薄膜, 加入一定量 RNase free 水, 37 °C 下水化脂质薄膜, 水化混悬液用细胞破碎仪进行超声分散, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得到 Que-SLNs。

同法不加槲皮素以制备空白 SLNs。

2.1.2 包封率及载药量的测定 采用高速离心法结合 HPLC 法, 测定 Que-SLNs 中槲皮素含量, 并计算其包封率及载药量^[30]。

$$\text{包封率} = W_a / W_b$$

$$\text{载药量} = W_a / W_w$$

W_a 表示纳米粒载体中槲皮素的质量, W_b 表示槲皮素投药量, W_w 表示纳米粒中槲皮素的质量加上载体材料的质量

2.1.3 粒径及 Zeta 电位的测定 利用 ZEN3600 系列纳米激光粒度仪测定纳米粒的粒径分布及 Zeta 电位。取 0.1 mL 固体脂质纳米粒混悬液稀释至 1 mL, 设置纳米粒度仪温度为 25 °C, 平衡时间为 2 min, 每个样品重复测定 3 次。

2.2 槲皮素 HPLC 含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-0.2%磷酸水溶液 (60:40) 为流动相; 检测波长为 370 nm; 柱温为 35 °C; 进样量 10 μL; 体积流量为 0.8 mL/min; 理论塔板数按槲皮素峰计算不低于 2 000。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称定槲皮素对照品适量置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 99.60 mg/L 的槲皮素对照品溶液作为对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的配制 精密量取 Que-SLNs 溶液 1 mL 至 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 分别精密量取槲皮素对照品溶液适量置于 25 mL 量瓶中, 配制成 1.99、3.98、7.96、11.94、15.92、23.88 mg/L 的系列质量浓度对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样检测, 记录峰面积。以槲皮素质量浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $A=29.601 C-6.502 4$, $r^2=0.999 6$, 结果表明槲皮素在 1.99~23.88 mg/L 具有良好的线性关系。

2.2.5 方法学考察 分别吸取槲皮素对照品溶液、Que-SLNs、空白 SLNs 各 10 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 结果如图 1 所示, 空白 SLNs 在槲皮素出峰处 (约 8.5 min) 无干扰, 说明本方法专属性良好。

分别取 1.99、7.96、23.88 mg/L 的槲皮素对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件分别于 1 d 内测定 6 次, 连续测定 3 d, 记录峰面积, 计算日内、日

间精密度均小于 2%, 说明仪器精密度良好。

分别取同一批次的 Que-SLNs 供试品 6 份, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定峰面积, 计算得槲皮素质量浓度的 RSD 值为 0.82%, 表明该方法重复性良好。

精密吸取槲皮素供试品溶液于制备后 0、2、4、6、8、12、24 h 下, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定峰面积, 结果 24 h 内供试品溶液中槲皮素峰面积的 RSD 值为 1.04%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

精密吸取 1 mL 空白固体脂质纳米粒溶液 9 份, 分成 3 组, 置于 10 mL 量瓶中, 每组分别精密加入 1 mL 的低、中、高质量浓度 (1.99、7.96、23.88 mg/L) 的槲皮素对照品溶液, 用甲醇定容至刻度, 按“2.1.1”项下色谱条件进样, 测定槲皮素的含量, 计算回收率。结果表明, 低、中、高 3 个质量浓度的平均回收率分别为 102.72%、100.32%、97.34%, RSD 值分别为 1.36%、0.71%、0.80%, 表明该方法准确度良好。

2.3 Que-SLNs 制备工艺考察及优化

2.3.1 槲皮素投药量的考察 分别取 0.5、1.0、1.5 mg 槲皮素, 按照上述处方和工艺, 制备 Que-SLNs, 考察不同槲皮素投药量对所制得纳米粒的粒径、多分散指数 (PDI) 以及包封率的影响。结果如表 1 所示, 随着投药量增加, 包载效果逐渐降低, 平均粒径和 PDI 逐渐增大, 故选用 0.5 mg 槲皮素作为处方投药量。

2.3.2 有机溶剂比例的考察 取 0.5 mg 槲皮素与上述处方中脂质材料, 溶于不同比例的氯仿与无水乙醇混合溶剂 (1:1、2:1、5:1) 中, 按照上述工艺制备 Que-SLNs。结果如表 2 所示, 当氯仿比例增加时槲皮素的包封率增加, 但对粒径影响不大, 故选择氯仿-无水乙醇为 5:1 混合溶剂作为油相。

2.3.3 GMS/SPC 比例的考察 取 0.5 mg 槲皮素与表 1 不同槲皮素投药量对 Que-SLNs 平均粒径、PDI、包封率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of quercetin feeding amount on average diameter, PDI and encapsulation efficiency of Que-SLNs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

槲皮素/mg	平均粒径/nm	PDI	包封率/%
0.5	134.10±3.03	0.28±0.04	79.07±0.84
1.0	239.33±4.62	0.48±0.08	78.53±9.19
1.5	311.70±7.85	0.49±0.01	76.43±7.69

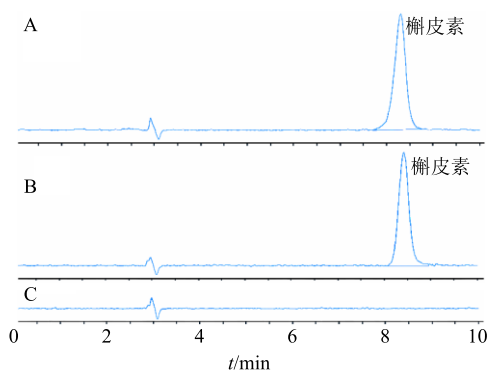


图 1 槲皮素对照品 (A)、Que-SLNs (B)、空白 SLNs (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectra of quercetin (A), Que-SLNs (B) and blank nanoparticles (C)

表 2 不同有机溶剂组合对 Que-SLNs 粒径、PDI、包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Effects of mixed organic solvent ratios on average diameter, PDI and encapsulation efficiency of Que-SLNs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

氯仿-无水乙醇	平均粒径/nm	PDI	包封率/%
1:1	129.53±3.47	0.38±0.05	68.12±0.56
2:1	122.77±2.08	0.46±0.08	74.54±2.98
5:1	132.77±4.02	0.39±0.02	79.07±0.84

不同比例 GMS/SPC (2:1、1:1、1:2、1:4), 溶于混合溶剂中, 按照上述工艺制备 Que-SLNs。结果如表 3 所示, 在增加 SPC 的比例时, Que-SLNs 粒径在 GMS/SPC 比例为 1:2 时有最小值, 包封率在 GMS/SPC 比例为 1:2 时有最大值, 故确定 GMS/SPC 比例为 1:2, 磷脂在体系中作为辅助脂质和乳化剂, 在比例较小时随着它的增加, 可以增加药物的包封率。但继续增加其比例时, 包封率反而下降, 且粒径也有所增加, 可能原因是, 较大比例的磷脂在体系中有大量生成脂质体的倾向, 反而不利于药物和脂质之间的亲和力。

表 3 不同 GMS/SPC 比例对 Que-SLNs 粒径、PDI、包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Effects of GMS/SPC ratios on average diameter, PDI and encapsulation efficiency of Que-SLNs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

GMS/SPC	平均粒径/nm	PDI	包封率/%
2:1	216.67±5.51	0.39±0.18	70.79±6.45
1:1	141.37±11.08	0.45±0.10	76.74±3.61
1:2	116.60±1.21	0.29±0.02	82.05±0.83
1:4	149.87±8.40	0.50±0.08	60.60±1.33

2.3.4 DDAB 用量的考察 DDAB 是阳离子 SLNs 的重要组成, 对 miRNAs 加载性能影响较大, 故对 SLNs 中 DDAB 用量进行考察。取 0.5 mg 槲皮素与上述处方中脂质材料, 改变不同 DDAB 的用量 (0、5、10 mg) 溶于氯仿与无水乙醇混合溶剂中, 按照上述工艺制备 Que-SLNs。结果如表 4 所示, 随着 DDAB 增加, 槲皮素的包封率增加, 但平均粒径逐渐增大, 可能的原因是 DDAB 作为一种 W/O 型乳化剂, 在制备的过程中有利于槲皮素与脂质之间充分接触, 从而提高包封率; 同时 DDAB 又作为一类季铵盐类阳离子脂质, 随着它的量增加, 潜在的细胞毒性也会增加。故确定为 DDAB 投入量为 5 mg 制备 Que-SLNs。

表 4 不同 DDAB 投入量对 Que-SLNs 粒径、PDI、包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Effects of feeding amount of DDAB on average diameter, PDI and encapsulation efficiency of Que-SLNs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

DDAB/mg	平均粒径/nm	PDI	包封率/%
0.0	79.37±2.76	0.39±0.03	58.26±2.38
5.0	114.20±1.57	0.32±0.01	86.66±10.34
10.0	124.17±2.20	0.28±0.01	92.99±1.40

2.3.5 超声时间与功率的考察 取 0.5 mg 槲皮素与上述处方中脂质材料, 溶于氯仿与无水乙醇混合溶剂中, 改变不同的探超条件, 按照上述工艺制备 Que-SLNs。结果如表 5 所示, 随着超声功率以及超声时间的增加, 纳米粒的粒径有所下降, 而对包封率的影响并不是很大。但考虑的制备 Que-SLNs 溶液体积较小, 长时间使用较大功率会对仪器造成损坏, 而选择比较温和的超声功率, 增加它的超声时间同样也能制备粒径较小, 包封率较高的槲皮素固体脂质纳米粒。综上, 选择超声功率为 400 W, 超声时间为 6 min 的条件即可。

表 5 不同超声功率和时间对 Que-SLNs 粒径、PDI、包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Effects of ultrasound power and ultrasound time on average diameter, PDI and encapsulation efficiency of Que-SLNs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

功率及时间	平均粒径/nm	PDI	包封率/%
400 W、3 min	146.07±5.92	0.37±0.04	85.91±2.44
400 W、6 min	110.00±2.10	0.30±0.01	88.42±3.56
800 W、3 min	116.60±1.21	0.29±0.02	88.92±4.30
800 W、6 min	111.87±1.21	0.31±0.04	84.98±4.83

2.4 Que-SLNs 制备工艺和处方的确定

根据上述单因素考察结果, 优选 Que-SLNs 处方和制备工艺如下: 称取 GMS 5 mg, SPC 10 mg, 胆固醇 5 mg, DDAB 5 mg 和一定量槲皮素, 5 mL 三氯甲烷-无水乙醇 (5:1) 的混合溶剂溶解, 并充分反应, 然后减压旋蒸除去有机溶剂形成一层均匀的薄膜, 接着用 RNase free 水水化薄膜, 接着用超声功率为 40% 探头超声 6 min, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得 Que-SLNs, 制备 3 批样品, 测得其包封率为 (85.25±1.29) %, 载药量为 (1.67±0.02) %, 粒径为 (110.00±2.10) nm, PDI 为 0.30±0.01, Zeta 电位为 (53.20±5.12) mV ($n=3$)。Que-SLNs 的粒径分布、Zeta 电位和外观见图 2。

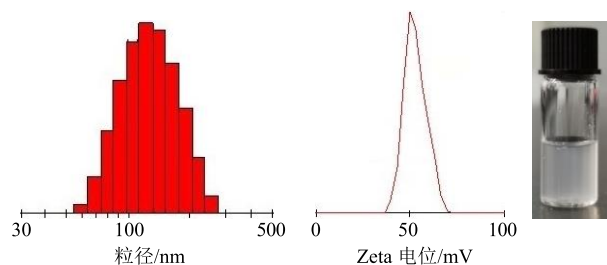


图 2 Que-SLNs 的粒径分布、Zeta 电位和外观

Fig. 2 Particle size, Zeta potential and characterization of Que-SLNs

2.5 不同纳米复合物的制备

取 50 μL Que-SLNs 溶液, 逐滴加入等体积的 miRNAs 溶液, 在室温下轻轻振摇 30 min, 即得 Que/mR150 SLNs 复合物溶液。并控制体积不变, 稀释纳米粒至不同质量浓度, 以改变不同阳离子材料 DDAB 与 mR150 的质量比 (DDAB/RNA), 分别制备不同的 Que/mR150 SLNs 复合物。

2.6 不同纳米复合物的表征

2.6.1 不同纳米复合中 miRNAs 包载性能考察 将不同 DDAB/RNA 的 Que/mR150 SLNs 复合物稀释至 1 mL, 于 ZEN3600 纳米粒度仪下测其粒径和 Zeta 电位, 设置温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 平衡时间 2 min, 结果见图 3。

结果表明, 空白 Que-SLNs 的平均粒径为 $(110.27 \pm 2.15) \text{ nm}$, PDI 为 0.28 ± 0.01 ; 负载 mR150 后, 在 DDAB/RNA 比例为 6:1 时, Que/mR150 SLNs 的平均粒径为 $(201.87 \pm 0.74) \text{ nm}$, PDI 为 0.13 ± 0.03 。在 DDAB/RNA 比例为 4:1 时呈现负电荷, 因为低质量浓度的 DDAB-Que-SLNs 不足以缩合大量的 miRNAs。

2.6.2 琼脂糖凝胶电泳实验^[31-32] 称取 0.3 g 琼脂糖溶于 30 mL TAE 缓冲液, 微波炉加热溶液, 沸腾 2 次至完全溶解, 配制成 1% 琼脂糖胶液, 加入 5 μL ExGreen 摇匀, 倒入制胶玻璃槽内, 插入梳子, 30 min 待胶冷却后, 放入电泳池中。分别取 10 μL 不同 DDAB/RNA 比值样品与 5 μL 上样缓冲液混合, 每孔上样 10 μL , 在 TAE 缓冲液中, 100 V 恒压电泳 15 min, 凝胶成像系统观察并拍照, 结果见图 4。结果表明, 裸 miRNAs 在孔中无滞留, 游离条带很亮; 在 DDAB/RNA 为 4:1 时, 有一部分留着孔内, 有一部分游离条带, 表示 miRNAs 未被压缩完全。另一方面, 在 DDAB/RNA 比值为 6:1 时, 游离的 miRNAs 几乎没有, 而全部滞留在孔中, 表明 miRNAs 几乎全部压缩在固体脂质纳米粒中, 这与

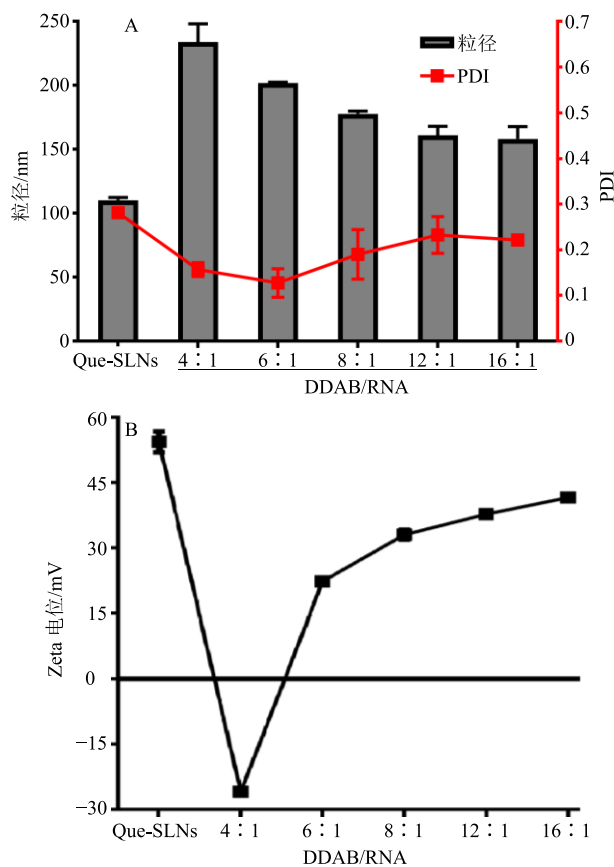


图 3 不同 DDAB/RNA 质量比 Que/mR150 SLNs 的粒径 (A) 与电位 (B) 变化

Fig. 3 Changes in size (A) and Zeta potential (B) of Que/mR150 SLNs for different DDAB/RNA ratios

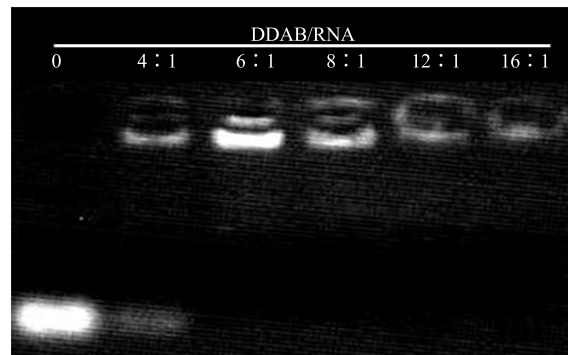


图 4 不同 DDAB/RNA 对 Que-SLNs 吸附 miRNAs 的影响
Fig. 4 Effect of different DDAB/RNA ratios on miRNAs adsorption of Que-SLNs

在不同纳米复合中 miRNAs 包载性能考察所得结论相吻合, 进一步说明最优的 DDAB/RNA 为 6:1, 所以后续实验采用 DDAB/RNA 为 6:1 来确定 mR150 和 Que-SLNs 的加入量。

2.6.3 Que/mR150 SLNs 形态学观察 将所制备的空白 SLNs 和 Que-SLNs, DDAB/RNA 为 6:1 的 Que/mR150 SLNs 用纯水稀释至适宜浓度滴至铜网

上,用 2%磷钨酸染色后自然晾干,用透射电镜观察其形态,并拍摄照片,结果见图 5。结果表明 SLNs 与 Que-SLNs 形态比较规则圆整,大小相差不大,粒径在 110 nm 左右,载 mR150 纳米粒比 Que-SLNs 稍大,粒径在 200 nm 左右,这与动态光散射法所

测得结果相一致。

2.6.4 Que-SLNs 初步稳定性考察 按照已确定处方,制备 3 批 Que-SLNs,避光保存在 4 ℃ 条件下,在 2 个月内测定其粒径与 Zeta 电位,结果见表 6。结果显示 Que-SLNs 在 2 个月内稳定。

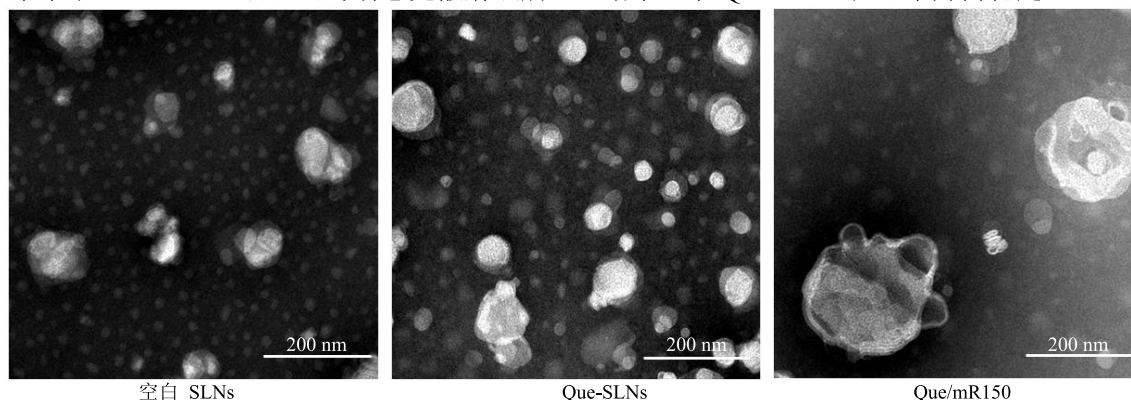


图 5 空白 SLNs、Que-SLNs、Que/mR150 SLNs 的 TEM 图

Fig. 5 TEM of blank SLNs, Que-SLNs and Que/mR150 SLNs

表 6 Que-SLNs 的储存稳定性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Storage stability of Que-SLNs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/d	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
0	111.87±1.21	0.31±0.04	58.07±5.49
1	112.43±0.61	0.31±0.01	57.50±3.27
4	107.57±1.55	0.34±0.08	48.23±7.31
7	116.40±2.26	0.35±0.05	57.40±2.91
14	108.17±2.39	0.36±0.07	50.77±6.2
30	109.57±2.19	0.34±0.05	50.77±1.12
60	113.33±2.89	0.4±0.01	49.77±2.21

2.7 Que-SLNs 的体外释放

本实验采用透析法进行体外释药研究,设定空气浴摇床温度为 37 ℃,振荡频率为恒速 100 r/min。每组设置 3 个平行样,取 Que-SLNs 胶体溶液 2 mL 置透析袋中,排出气泡,并将两端扎紧,置 50 mL 含有 1%聚山梨酯 80 生理盐水溶液中,在预定时间点(0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、48 h)取样 1 mL,同时补加 1 mL 相同温度的释放介质。将所取样品在 7 000 r/min 条件下离心 15 min,取 10 μL 样品按“2.1.1”项下色谱条件下进样分析,计算累积释放率(Q_n)。同法以相同质量浓度槲皮素原料药的丙二醇溶液作为对照进行体外释放试验。结果见图 6。由图可知,游离槲皮素在 4 h 时已基本已释放完全。而 Que-SLNs 溶液释放前期较快,后期较慢,48 h 内释放量达(80.69±1.29)%,总体呈现明显的缓释作用。经拟合累计释放率符合一级动力学方

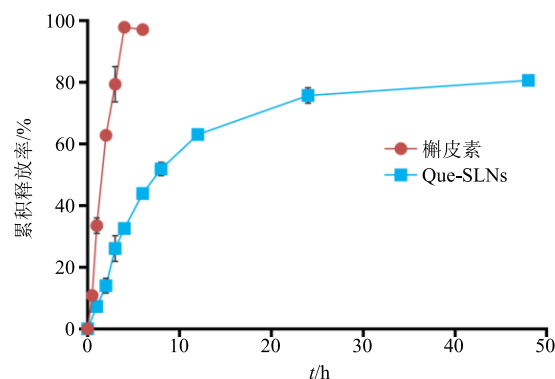


图 6 槲皮素游离形式与 Que-SLNs 中槲皮素的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 *In vitro* release curves of free quercetin and Que-SLNs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

程,拟合方程为 $\ln(1-Q_n)=-0.126\ 09\ t-0.806\ 08$, $r^2=0.996\ 6$ 。

2.8 Que-SLNs 的细胞毒性考察

人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC 培养于 37 ℃、5% CO₂ 条件下,取生长状态良好的 HUVEC 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化后,加入含有 10%胎牛血清的完全培养基终止消化反应,并吹打均匀。在血球计算板上计数,调整细胞悬液浓度,种板于 96 孔板中(每孔 5 000 个),在培养箱中继续培养 24 h 待细胞贴壁后,弃去培养基,换上含有不同质量浓度梯度药物的新鲜培养基(药物含空白纳米浓度梯度分别为 50、75、100、150、200 mg/L),与细胞孵育 4 h 后,更换新鲜含有 10%胎牛血清完全培养基继

续培养 48 h, 每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液继续孵育 4 h 后, 弃去原有培养基, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液, 与摇床上低速振荡 15 min, 然后在 490 nm 处, 用酶联免疫检测仪以 490 nm 波长测定吸光度 (A) 值。每组设置 4 个复孔, 以不加药的无血清培养基的细胞孔为对照, 并设不加细胞孔为调零对照, 计算细胞存活率。按公式细胞存活率 = $(A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{调零}})$ 计算细胞存活率, 结果见图 7。结果表明, SLNs 和 Que-SLNs 纳米溶液在纳米材料质量浓度为 50~150 mg/L 时对 HUVEC 细胞存活均没有明显影响, 但 200 mg/L SLNs 与细胞共孵育后, 细胞存活率下降为 78.84%。为避免高浓度聚合物材料对细胞存活造成降低, 故选择 50~150 mg/L 的纳米材料质量浓度进行后续的细胞摄取实验。

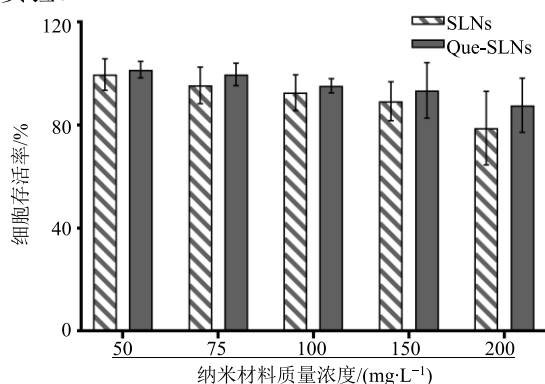


图 7 不同纳米材料质量浓度下纳米粒对 HUVEC 细胞的增殖影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 7 Effects of different blank nanoparticle concentrations on proliferation of HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

2.9 HUVEC 的细胞摄取实验

2.9.1 双荧光标记 Que/mR150 SLNs 的制备 用香豆素-6(coumarin-6)代替槲皮素, cy5 标记的 mR150 代替 mR150, 按照“2.5”项下方法制备双荧光标记的 Que/mR150 SLNs (C6-SLNs/cy5-mR150)。

2.9.2 双荧光标记 C6-SLNs/cy5-mR150 的细胞摄取实验 取对数生长期 HUVEC 细胞, 种 1×10^5 个 HUVEC 细胞铺在激光共聚焦专用玻底皿, 贴壁过夜后, 每皿给 500 μL 双荧光标记固体脂质纳米粒 (含 0.5 μg cy5 标记的 mR150, 0.17 μg Coumarin-6) 4 h 后, 弃去药液, 用 PBS 洗涤 2 次, 用 4% 多聚甲醛固定约 10 min 后, 继续用 PBS 洗涤 2 次后, 加入 DAPI 染液孵育 5 min 后, 加入两滴抗荧光衰减液, 在激光共聚焦下观察细胞摄取药物情况。结果如图 8, DAPI 标记的细胞核带蓝色荧光, Coumarin-6

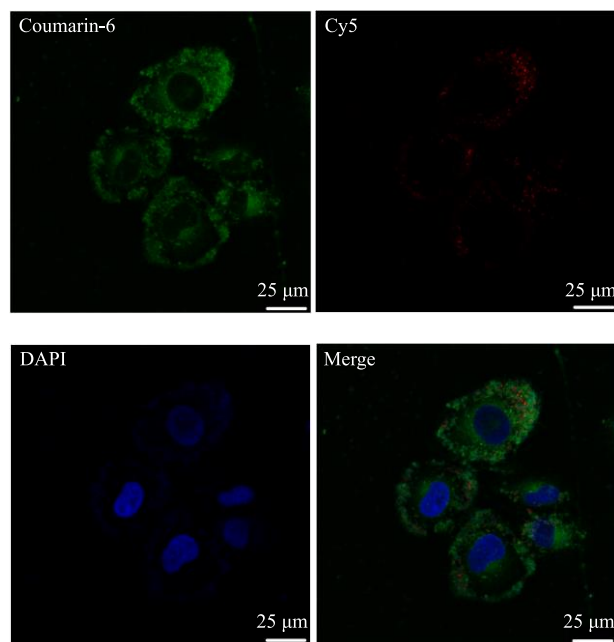


图 8 双荧光标记的 C6-SLNs/cy5-mR150 在 HUVEC 细胞上的激光共聚焦摄取结果

Fig. 8 Confocal laser scanning microscopy images of uptake of C6-SLNs/cy5-mR150 in HUVEC

与 mR150 (cy5) 被摄取进胞质分别带绿色荧光和红色荧光, 说明载药 SLNs 已进入胞质中, 但其入胞机制有待进一步研究。

2.10 Que/mR150 SLNs 的眼部刺激考察

2.10.1 Que/mR150 SLNs 的眼部刺激考察 选取健康新西兰大白兔 5 只, 分别给予健康家兔左眼滴生理盐水 50 μL , 右眼滴注 50 μL Que/mR150 SLNs, 分别记录单次给药后 2、6、12、24、72、120、168 h 兔眼的局部反应情况。按照 Draize^[33-34]眼部刺激试验评分标准进行眼刺激性评价。结果显示, Que/mR150 SLNs 组多数在第 1 次给药见结膜有少量分泌物, 平均评分为 0.80 ± 0.45 , 其余时间点均为 0 分, 均在 0~3 分的无刺激性范围。

2.10.2 角膜组织学观测 给药的第 7 天分离出角膜组织, 在 10% 福尔马林溶液中固定, 再用梯度酒精溶液脱水, 在二甲苯溶液中清洗, 再用石蜡固定。对石蜡进行切片, 厚度为 3 μm , 用苏木精-伊红染色, 显微镜观察角膜及视网膜组织学改变, 结果见图 9。由图 9 可知, NS 和 Que/mR150 SLNs 组的角膜上皮细胞都较为完整, 细胞排列紧密, 基质层纤维排列规则, 均未见炎性细胞。结果表明 Que/mR150 SLNs 对家兔角膜上皮细胞无明显损伤, 较为安全。

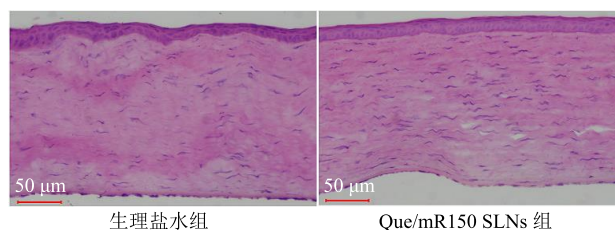


图 9 兔角膜组织病理学切片图片

Fig. 9 Pathological section of rabbit cornea under microscope

3 讨论

SLNs 的制备方法主要有高压乳匀法^[35]、乳化蒸发-低温固化法^[36-38]、薄膜-超声法^[39]、熔融超声法^[40]、微乳法^[41]等,但是乳化蒸发-低温固化法等方法在制备的过程中需要加热温度比较高,可能使槲皮素发生降解。而薄膜-超声法条件温和,制备工艺简单稳定可靠,重复性好,适用于不稳定药物 SLNs 的制备。因此,本实验选用薄膜-超声法制备阳离子 Que-SLN,并利用 Que-SLN 表面所带的正电荷吸附 mR150,构建联合包载 mR150 与槲皮素的 Que/mR150 SLNs。

在实验中,Que/mR150 SLNs 复合物的粒径随着 DDAB/RNA 比例增加而减小,值得注意的是 Que/mR150 SLNs 复合物溶液的 PDI 值远远小于空白 Que-SLN 溶液的 PDI 值,且在 DDAB/RNA 比例为 6:1 时最小。可能原因是,没有加 mR150 的槲皮素固体脂质纳米粒表面较粗糙,粒子粒径分布不均一,而与 mR150 复合后,Que-SLN 溶液被一定程度的稀释,等体积 mR150 能有效的缩合在固体脂质纳米粒的表面,使粒子分布更加规则、均一。在 DDAB/RNA 比例为 4:1 时呈现负电荷,因为低质量浓度的 DDAB-Que-SLN 不足以缩合大量的 mR150。随着 DDAB-Que-SLN 的量逐渐增加时,Que/mR150 SLNs 复合物的 Zeta 电位也在逐渐增加。Zeta 电位增加的趋势逐渐趋于平缓,说明 mR150 有逐渐被完全缩合的趋势。

在琼脂凝胶电泳试验中,在 DDAB/RNA 质量比大于 6:1 时,胶孔中 mR150 滞留量比 6:1 时要少,可能是高浓度的聚合物材料在 mR150 凝胶电泳过程中,造成了包裹和干扰,所以当 DDAB/RNA 质量比达到 12:1,甚至 16:1 时,miRNA 条带变得弥散,且亮度减弱。同时,Que/mR150 SLNs 复合物在 DDAB/RNA 比例为 4:1 时未将 mR150 缩合完全,所以有游离条带,在比例为 6:1 时起便无

游离条带,说明可在较低的 DDAB/RNA 下可完成对 mR150 的包载,这也验证了之前的结论。在制剂处方筛选中,虽然根据药物的理化性质筛选了较优处方和比例,但未从药效的角度调整槲皮素与 mR150 的剂量。在接下的研究中,本课题组将进行药效学研究。同时,还将对阳离子固体脂质纳米粒增加相关配体,进一步优化制剂处方比例以获得更好的疗效。

参考文献

- [1] Rozing M P, Durhuus J, Krogh N M, *et al.* Age-related macular degeneration: A two-level model hypothesis [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2020, 76: 100825.
- [2] Shao Y, Yu H T, Yang Y, *et al.* A Solid dispersion of quercetin shows enhanced Nrf2 activation and protective effects against oxidative injury in a mouse model of dry age-related macular degeneration [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, doi: 10.1155/2019/1479571.
- [3] Blasiak J. Senescence in the pathogenesis of age-related macular degeneration [J]. *Cell Mol Life Sci.*, 2020, 77(5): 789-805.
- [4] 危清泉, 于 靖. 年龄相关性黄斑变性抗氧化剂治疗进展 [J]. *眼科新进展*, 2017, 37(8): 785-787.
- [5] Weng Y H, Liu J, Jin S B, *et al.* Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(3): 281-291.
- [6] Mishra G P, Bagui M, Tamboli V, *et al.* Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery [J]. *J Drug Deliv*, 2011, 2011: 1-14.
- [7] 马 纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(8): 221-224.
- [8] 徐文斌, 周青峰, 朱雪琼. 槲皮素抗宫颈癌作用的研究进展 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(10): 1276-1279.
- [9] Du G L, Zhao Z M, Chen Y H, *et al.* Quercetin protects rat cortical neurons against traumatic brain injury [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6): 7859-7865.
- [10] Kook D, Wolf A H, Yu A L, *et al.* The protective effect of quercetin against oxidative stress in the human RPE *in vitro* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(4): 1712-1720.
- [11] Weng S S, Mao L, Gong Y Y, *et al.* Role of quercetin in protecting ARPE-19 cells against H₂O₂ induced injury via nuclear factor erythroid 2 like 2 pathway activation and endoplasmic reticulum stress inhibition [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 3461-3468.
- [12] Zhuang P, Shen Y, Lin B Q, *et al.* Effect of quercetin on formation of choroidal neovascularization (CNV) in

- age-related macular degeneration (AMD) [J]. *Eye Sci*, 2011, 26(1): 23-29.
- [13] 张佳君, 厉新新, 陈宝石, 等. 槲皮素对 H_2O_2 诱导人 RPE 细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. 国际眼科杂志, 2016, 16(11): 2010-2013.
- [14] Hytti M, Piippo N, Salminen A, *et al*. Quercetin alleviates 4-hydroxynonenal-induced cytotoxicity and inflammation in ARPE-19 cells [J]. *Exp Eye Res*, 2015, 132: 208-215.
- [15] Zhu Q, Liu M X, He Y X, *et al*. Quercetin protect cigarette smoke extracts induced inflammation and apoptosis in RPE cells [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 2010-2015.
- [16] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [17] Anand S, Cheres D A. Emerging role of micro-RNAs in the regulation of angiogenesis [J]. *Genes Cancer*, 2011, 2(12): 1134-1138.
- [18] Krek A, Grün D, Poy M N, *et al*. Combinatorial microRNA target predictions [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(5): 495-500.
- [19] 吕 洋, 侯慧媛, 王雨生. miRNA 在脉络膜新生血管发生发展中的作用研究进展 [J]. 眼科新进展, 2015, 35(3): 283-286.
- [20] Shen J, Yang X R, Xie B, *et al*. MicroRNAs regulate ocular neovascularization [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(7): 1208-1216.
- [21] Liu C H, Sun Y, Li J, *et al*. Endothelial microRNA-150 is an intrinsic suppressor of pathologic ocular neovascularization [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(39): 12163-12168.
- [22] Wang S, Olson E. AngiomiRs-key regulators of angiogenesis [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(3): 205-211.
- [23] Dentelli P, Rosso A, Orso F, *et al*. microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(8): 1562-1568.
- [24] Liu K P, Li F W, Li Y, *et al*. Preparation, pharmacokinetics, and tissue distribution properties of icariin-loaded stealth solid lipid nanoparticles in mice [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(2): 170-174.
- [25] Shi S J, Han L, Gong T, *et al*. Systemic delivery of microRNA-34a for cancer stem cell therapy [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(14): 3901-3905.
- [26] Merodio M, Irache J M, Valamanesh F, *et al*. Ocular dis-position and tolerance of ganciclovir-loaded albumin nanoparticles after intravitreal injection in rats [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(7): 1587-1594.
- [27] Motwani S K, Chopra S, Talegaonkar S, *et al*. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and *in vitro* characterisation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68(3): 513-525.
- [28] 苗 恒, 陶 勇. 巩膜对大分子物质的通透性研究 [J]. 中华眼科医学杂志, 2014, 4(3): 168-172.
- [29] Jiang K, Hu Y, Gao X, *et al*. Octopus-like flexible vector for noninvasive intraocular delivery of short interfering nucleic acids [J]. *Nano Lett*, 2019, 19(9): 6410-6417.
- [30] 石三军. 基于固体脂质纳米粒的肿瘤干细胞治疗研究 [D]. 成都: 四川大学, 2014.
- [31] 柳 莹. 适配体修饰共载法舒地尔和 miRNA-195 纳米粒的制备及抗肝癌作用研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2017.
- [32] 李 言. 适配子和类脂多胺修饰的阳离子脂质体负载 let-7a 靶向治疗肺癌 [D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [33] Friedenwald J S, Hughes W F, Hermann H. Acid-base tolerance of the corneal [J]. *Arch Ophthalmol*, 1944(31): 279-283.
- [34] 王庆利, 彭 健. Draize 眼刺激性试验的评价 [J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(4): 301-304.
- [35] Jennings V, Mader K, Gohla S H. Solid lipid nanoparticles based on binary mixtures of liquid and solid lipids: A 1H -NMR study [J]. *Int J Pharm*, 2000, 205(1/2): 15-21.
- [36] Sjostrom B, Kaplun A, Talmon Y, *et al*. Structure of nanoparticles prepared from oil-in-water emulsions [J]. *Pharm Res*. 1995, 12(1): 39-48.
- [37] 孙洁胤, 周芝芳, 刘 放, 等. 苦参素固体脂质纳米粒的药动学和体内分布 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(14): 1091-1094.
- [38] 谢 燕, 崔晓鸽, 张智强. 延胡索乙素固体脂质纳米粒缓释片制备及工艺优化 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(21): 2134-2140.
- [39] Shi S J, Han L, Deng L, *et al*. Dual drugs (microRNA-34a and paclitaxel)-loaded functional solid lipid nanoparticles for synergistic cancer cell suppression [J]. *J Control Release*, 2014, 194: 228-237.
- [40] Li X, Nie S F, Kong J, *et al*. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers [J]. *Int J Pharm*. 2008, 363(1/2): 177-182.
- [41] 李 楠, 李锡晶, 王 倩. 微乳法制备姜黄素固体脂质纳米粒 [J]. 中国药房, 2015, 26(19): 2698-2702.