

pH 敏感电荷反转型姜黄素纳米粒子的制备及体外评价

郭庆发^{1*}, 毓英荣², 曹慧¹, 刘世武¹

1. 潍坊学院 山东省高等学校生物化学与分子生物学重点实验室, 山东 潍坊 261061

2. 莒县人民医院 急诊科, 山东 日照 276500

摘要: **目的** 制备 pH 敏感电荷反转型姜黄素纳米粒子 (PCE/Cur NPs), 优化制备工艺并考察 PCE/Cur NPs 的理化性质及其对黑色素瘤 (B16) 细胞的抑制作用。 **方法** 在正电性材料甲氧基聚乙二醇-聚己内酯-聚乙烯亚胺 (MPEG-PCL-PEI, PCE) 的基础上键合 1,2-环己二酸酐使其变成负电性材料, 制备带负电的 PCE/Cur NPs, 该纳米粒子具有 pH 值依赖性, pH 值 > 7 时, PCE/Cur NPs 不发生化学变化, 显示负电性, pH 值 < 6 时, PCE/Cur NPs 发生化学反应, 水解掉 1,2-环己二酸, 显示正电性。考察了其形态、粒径、载药量、包封率与体外释放等理化特性; 通过 MTT 法、划痕实验进行检测, 验证 PCE/Cur NPs 对 B16 细胞的抑制作用、抗增殖侵袭能力。 **结果** 获得了 PCE/Cur NPs, 透射电子显微镜下观察所得纳米粒子形态外观圆整, 大小均匀, 无黏连, 平均粒径为 (80±5) nm; 包封率为 (90.0±2.0)%; 载药量为 (8.0±1.0)%; 48 h 时, PCE/Cur NPs 释放趋于恒速, 释放缓慢, 累积释放达到 (69.2±5.2)% (pH 7.4) 与 (71.2±4.3)% (pH 5.0); 细胞实验显示, PCE/Cur NPs 能够显著抑制 B16 细胞的生存和增殖能力, 具有剂量和时间依赖性。 **结论** 成功制备了 PCE/Cur NPs, 对抑制 B16 细胞增殖效果良好, 为开发智能型抗肿瘤给药系统提供了理论依据。

关键词: 姜黄素; 聚乙二醇-聚己内酯-聚乙烯亚胺共聚物; pH 敏感纳米粒子; 电荷反转; B16 细胞

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)03-0598-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.010

Preparation and *in vitro* evaluation of pH-sensitive charge-reversal nanoparticles loaded with curcumin

GUO Qing-fa¹, GUO Ying-rong², CAO Hui¹, LIU Shi-wu¹

1. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in Universities of Shandong Province, Weifang University, Weifang 261061, China

2. Department of Emergency, Juxian People's Hospital, Rizhao 276500, China

Abstract: Objective To prepare charge-reversal pH-sensitive nanoparticles loaded with curcumin (PCE/Cur NPs), and investigate the optimizing technology, physicochemical characterizations, and inhibitory effect on B16 cell. **Methods** The β -carboxyl amidized cationic MPEG-PCL-PEI polymers (PCE) were negatively charged, which were prepared into the negative PCE/Cur NPs with pH dependence. When pH > 7, there was no charge-reversal. When pH < 6, the β -carboxyl amides were hydrolyzed rapidly into corresponding amines. As a result, PCE/Cur NPs became positively charged again. The obtained PCE/Cur NPs were characterized by detection of particle size, morphology study, drug loading, encapsulation efficiency, and release study. The effect of anti-migratory and anti-invasive actions of PCE/Cur NPs on B16 cell was investigated using MTT assays and wound healing test. **Results** PCE/Cur NPs dependent on pH charge inversion were successfully prepared. The obtained PCE/Cur NPs were round, and the size was uniform, the adhesion was not found. The results showed that the prepared PCE/Cur NPs had the highest DL (8.0 ± 1.0)%, EE (90.0 ± 2.0)%, mean particle size of (80 ± 5) nm, and zeta potential of (-35 ± 5) mV. Within 48 h, the accumulative release rate was (69.2 ± 5.2)% (pH 7.4) and (71.2 ± 4.3)% (pH 5), respectively, and then PCE/Cur NPs released slowly. These results by MTT assay and wound healing assay indicated that PCE/Cur NPs not only inhibited the proliferation of B16 cells in a concentration- and time-dependent manner, but also can induce apoptosis. **Conclusion** PCE/Cur NPs were prepared successfully, which might have great potential application in drug delivery system.

Key words: curcumin; MPEG-PCL-PEI; pH-sensitive nanoparticles; charge-reversion; B16 cells

收稿日期: 2018-10-08

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (BS2015CL004); 潍坊市科技发展计划 (2015GX016)

*通信作者 郭庆发 (1980—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为药物新剂型与新技术研究。Tel: (0536)8785289 E-mail: qingfaguo@163.com

姜黄素 (curcumin, Cur) 是从天南星科和姜科植物的根茎中提取的多酚类化合物, 中药姜黄中主要有效成分之一。研究表明 Cur 具有多种药理活性, 如具有很强的镇痛、抗氧化、抗炎、抗败血症、抗肿瘤等^[1-9]。特别是 Cur 对人体的毒副作用小, 相对于普通化疗药物, Cur 能够更特异地杀伤肿瘤细胞。Cur 作为一种抗肿瘤药物, 能通过切断某些信号通路阻滞细胞周期或诱导细胞凋亡、抑制肿瘤细胞的侵袭与转移、减缓肿瘤内部的血管生成、影响炎症因子产生等作用来抑制肿瘤的发生^[3,10-12]。但是 Cur 的水溶性和稳定性较差, 口服生物利用度较低, 这在很大程度上限制了 Cur 的临床应用^[13-16]。

聚乙二醇-聚己内酯-聚乙烯亚胺 (MPEG-PCL-PEI, PCE) 是由生物相容性好、低毒的聚乙二醇、聚己内酯和聚乙烯亚胺合成的嵌段共聚物, 广泛应用于药物载体领域, 尤其是纳米粒子、微球等给药系统是近几年的研究热点^[17-18]。因此, 本课题以材料 PCE 为基础键合 1,2-环己二酸酐, 制备了 pH 敏感电荷反转型 Cur 纳米粒子 (PCE/Cur NPs), 为 Cur 应用于抗癌做出了有意义的探索。

1 仪器与材料

JEOL 透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; UV1810S 紫外可见分光光度计, 青岛聚创世纪环保科技有限公司; BX53 正置荧光显微镜, 上海普赫光电科技有限公司; R-210 旋转蒸发仪, 武汉杰思炜科技有限公司; ZEN3600 激光粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司。

辛酸亚锡 [Sn(Oct)₂]、聚乙亚胺 (PEI)、Cur, 美国 Sigma 公司; ε-己内酯 (ε-CL), 美国 Alfa Aesar 公司; 单甲氧基聚乙二醇 (MPEG), 相对分子质量为 2 000, 美国 Fluka 公司; 1,2-环己烷二酸酐, 二氯甲烷、石油醚, 成都科龙化工试剂厂; MTT 试剂, 分析纯, 上海化学试剂公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 分析纯, 上海阿拉丁生化科技有限公司。

B16 细胞, 湖南丰晖生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 pH 敏感电荷反转型嵌段共聚物 PCE 的合成

PCE 的合成路线^[19-20]参考本课题组以前的工艺。PCE 带有正电荷, 用 1,2-环己二酸酐 (B) 与 PCE 嵌段共聚物中的 PEI 段反应, 将 PEI 的胺基酰胺化为羧基酰胺, 得到带负电荷的酰胺化 PEI。当在酸性环境中, 特别当 pH 值 < 6 时, 1,2-环己烷二羧基酰胺基团自催化水解, 重新生成带有正电荷的

PCE。合成流程图见图 1。

2.2 PCE/Cur NPs 的制备

称取一定量的 Cur 与共聚物 PCE 粉末, 共同溶解于 2 mL 无水乙醇中, 在 55 °C 恒温水浴中以 70 r/min 的速度旋转蒸发数分钟, 待有机溶剂完全除去后, 加入 10 mL 经预热的超纯水, 轻微振荡, 可观察到载药纳米胶束溶液形成, 过 0.22 μm 水系滤膜, 收集滤液, 滤液澄清透明, 具有丁达尔现象。PCE/Cur 纳米胶束的形成过程如图 2 所示, 左下部分为制备纳米粒子的材料与药物混合粉末及其制备的纳米粒子溶液。部分用作接下来的各项表征, 部分经真空冷冻干燥至恒定质量后密封保存备用。

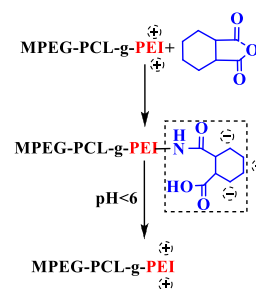


图 1 pH 值敏感电荷反转型嵌段共聚物 PCE 的合成流程图
Fig. 1 Synthetic illustration of pH sensitive charge-reversal polymer PCE

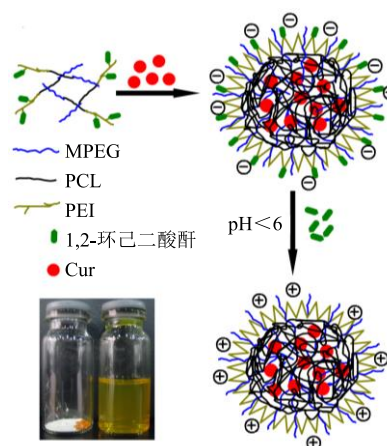


图 2 PCE/Cur NPs 的制备示意图
Fig. 2 Illustration of preparation of charge-reversal pH sensitive PCE/Cur NPs

2.3 PCE/Cur NPs 形貌观察

PCE/Cur NPs 的形貌使用 TEM 观察; 观察前, 先将 PCE/Cur NPs 用缓冲溶液 (pH 7.4) 稀释, 滴到铜网上, 然后用磷钨酸负染, 在室温下干燥, 然后观察。如图 3 所示 PCE/Cur NPs 大小基本均一, 平均粒径为 (80 ± 5) nm, 基本没有黏连现象。

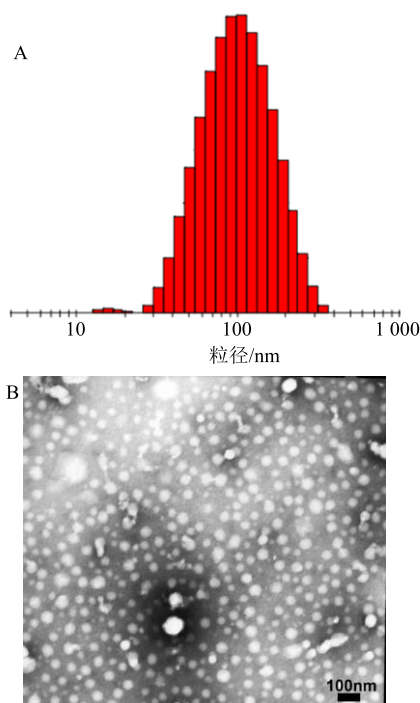


图 3 PCE/Cur NPs 的粒径分布 (A) 与 TEM 图片 (B)
Fig 3 Mean particle size distribution (A) and TEM photographs (B) of PCE/Cur NPs

2.4 PCE/Cur NPs 的 pH 值依赖性考察

配制 3 种缓冲溶液模拟正常组织 (pH 7.4)、肿瘤细胞内涵体 (pH 6.0)、溶酶体 (pH 5.0), 分别考察纳米颗粒在上述不同 pH 值条件下的电势与粒径随时间的变化, 考察 PCE/Cur NPs 的电荷反转情况及其粒径。取一定量的 PCE/Cur NPs 缓冲溶液 (pH 7.4), 电位为 (-30.0 ± 2.5) mV, 粒径为 (80.0 ± 3.5) nm, 分别转移到 pH 值为 7.4、6.0、5.0 的缓冲溶液中, 考察 PCE/Cur NPs 的粒径与电位随时间的变化。如图 4 所示, 在 pH 值为 7.4 的缓冲溶液中, PCE/Cur NPs 的电位几乎没发生实质性的变化, 维持在 -30 mV, 没有发生电荷翻转, 粒径变化也不大, 分析可知 1,2-环己二酸酐 (B) 在此条件下, 几乎不发生水解。而随着 pH 值的降低, 酸性增强, 特别是 pH 值为 5 的时候, PCE/Cur NPs 水解加快, PEI 链段上的 1,2-环己二酸酐水解掉, 电荷发生翻转, 带正电, 约为 25 mV, 但是在整个过程中, 粒径变化不大, 在 70~90 nm, 分析原因可能是亲水性 MPEG 的有效保护。

2.5 PCE/Cur NPs 的载药量和包封率的测定

准确称取一定量的冷冻干燥好的 PCE/Cur NPs, 加入一定体积的无水乙醇, 超声破坏纳米粒子, 紫外分光光度计于 418 nm 波长测定其吸光度 (A) 值,

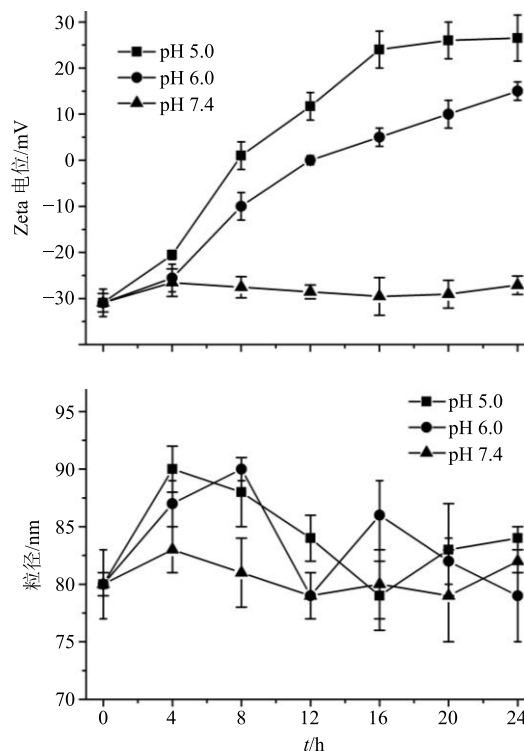


图 4 在不同 pH 条件下 PCE/Cur NPs 的电势与粒径随时间的变化

Fig 4 Changes of zeta potential and particle size of PCE/Cur NPs at different pH

根据标准曲线, 按公式计算载药量和包封率。

$$\text{载药量} = \frac{\text{实测药物含量}}{\text{药物含量} + \text{聚合物含量}}$$

$$\text{包封率} = \frac{\text{实测药物含量}}{\text{理论药物含量}}$$

在制备纳米粒子的过程中, 通过调整材料与 Cur 的比例, 可实现不同的载药量及包封率, 如表 1 所示, 通过测定不同投料比的 PCE/Cur NPs 中 Cur 的含量, 可观察到随着制备过程中 Cur 投料量的增加, PCE/Cur NPs 的实际载药量也相应增加, 而包封率相对会下降, 通过表 1 综合分析可知, 材料与 Cur 的投料比为 1:9, PCE/Cur NPs 的载药量与包封率为最佳, 分别为 $(9.7 \pm 0.1)\%$ 和 $(98.2 \pm 0.6)\%$ 。

表 1 PCE/Cur NPs 的载药量与包封率

Table 1 Drug loading and encapsulation efficiency of PCE/Cur NPs at various weight ratios

理论载药量/%	材料-Cur	实际载药量/%	包封率/%
5	5:95	4.6 ± 0.2	96.0 ± 1.5
10	10:90	9.7 ± 0.1	98.2 ± 0.6
15	15:85	14.3 ± 0.2	96.5 ± 0.7
20	20:80	19.2 ± 0.3	94.4 ± 1.9
25	25:75	22.6 ± 0.4	95.6 ± 1.2

2.6 PCE/Cur NPs 的体外释放

把 1 mL PCE/Cur NPs 溶液 (Cur 质量浓度 1 mg/mL) 放入透析袋 (截留相对分子质量 8 000~10 000) 中, 同时把 1 mL Cur 的 DMSO 溶液 (质量浓度 1 mg/mL) 也放入透析袋 (截留相对分子质量 8 000~10 000) 中作为对照。透析袋分别放入盛有 10 mL pH 值 7.4 与 5 的缓冲溶液的容器中, 放置在 37 °C 的摇床里。在预定时间, 把得到的释放液取出, 放入冰箱中 (-20 °C) 待测, 然后补充 10 mL 的新鲜的预热 (37 °C) 缓冲液。利用紫外分光光度法测定 Cur 的释放度。如图 5 所示, PCE/Cur NPs 有很好的缓控释作用, 在最初几个小时内, 释放较快, 6 h 内, PCE/Cur NPs 累积释放率分别为 (24.7±3.5)% (pH 7.4) 与 (28.8±4.2)% (pH 5.0), 有利于药物快速起效, 48 h 后, PCE/Cur NPs 释放趋于恒速, 释放缓慢, 累积释放率达到 (69.2±5.2)% (pH 7.4) 与 (71.2±4.3)% (pH 5.0), 酸性低, 释放较快, 可能与 PCE/Cur NPs 水解掉 1,2-环己二酸酐, 降低了 Cur 的溶出阻力有关。而游离的 Cur, 在 8 h 内, 无论是 pH 值 5.0 或 7.4 累积释放率都达到 (93.1±2.3)%。

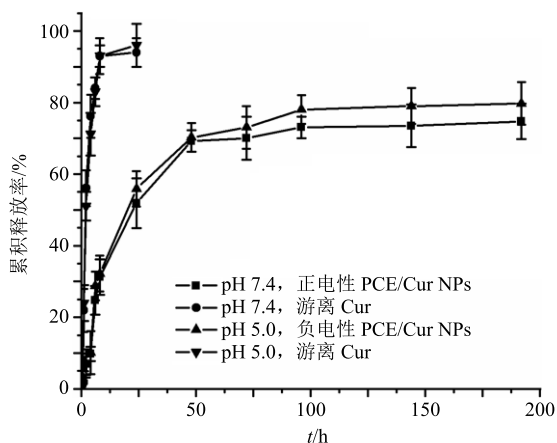


图 5 PCE/Cur NPs 的体外释放 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Release profile of PCE/Cur NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.7 PCE/Cur NPs 对 B16 细胞的增殖抑制作用

PCE/Cur NPs 的细胞增殖抑制实验通过 MTT 比色法测定。B16 细胞培养在含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液中, 放置于 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中生长。待细胞丰度为 70%~80% 时, 将 B16 细胞以细胞数为 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 孵育 24 h 后, 将不同质量浓度的试样分别加入至 96 孔板并在 37 °C 培养 24 h, 吸弃培养液, 并加入新鲜的无血清 DMEM 培养基 100 μ L 及 5 mg/mL MTT 溶液 10 μ L,

于 37 °C 孵育 4 h, 吸弃培养液, 加入 DMSO 溶液 100 μ L。以未加入样品的细胞为对照组, 在 570 nm 处测 A 值, 计算细胞存活率。

细胞存活率 = (试样处理细胞的 A 值 - 对照组细胞的 A 值) / (未经过处理组细胞的 A 值 - 对照组细胞的 A 值)

PCE/Cur NPs 对细胞的增殖抑制作用如图 6 所示, 各种制剂均对 B16 显示出了抑制作用, 随着质量浓度的增大, 细胞的增殖抑制作用越明显。可以看出不同的制剂对细胞的抑制作用差别明显, 正电性 PCE/Cur NPs 对细胞的抑制作用强于负电性 PCE/Cur NPs 与原料药组, 这可能与细胞表面带负电有关。

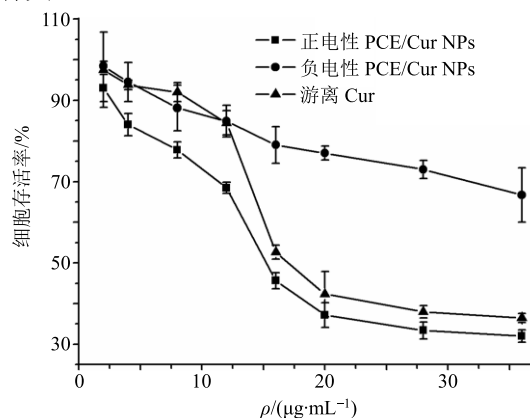


图 6 PCE/Cur NPs 对 B16 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Inhibitory rates of PCE/Cur NPs on B16 cells at different time points by MTT ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.8 PCE/Cur NPs 对 B16 细胞侵袭浸润能力的影响

收集处于对数生长期的 B16 细胞后调整细胞浓度 $4 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 个/mL 后, 接种于 24 孔板继续培养至细胞长至孔底部面积的 80%, 换成含 1% FBS 的 RPMI 1640 培养基继续培养 12 h, 用无菌 200 μ L 移液器枪头在 24 孔底部划出一条约 2 mm 宽直线区域, 用无菌 1×PBS 反复漂洗 24 孔板以洗脱漂浮的细胞及细胞碎片, 分别加入不同质量浓度 (主药含量计算) 梯度的样品, 未处理组 (A)、溶剂对照组 (B)、Cur 混悬液 8 μ g/mL (C)、12 μ g/mL (D)、16 μ g/mL (E) 及 PCE/Cur NPs 溶液 8 μ g/mL (F)、12 μ g/mL (G)、16 μ g/mL (H), 每组设 3 个复孔, 新鲜的培养基继续培养 24 h, 24 h 后在倒置显微镜下观察孔内细胞迁移能力变化情况, 结果见图 7。

迁移率 = (原划痕宽度 - 现划痕宽度) / 原划痕宽度

从图 7 中可以发现, PCE/Cur NPs 质量浓度在 8 μ g/mL (F)、12 μ g/mL (G)、16 μ g/mL (H) 时,

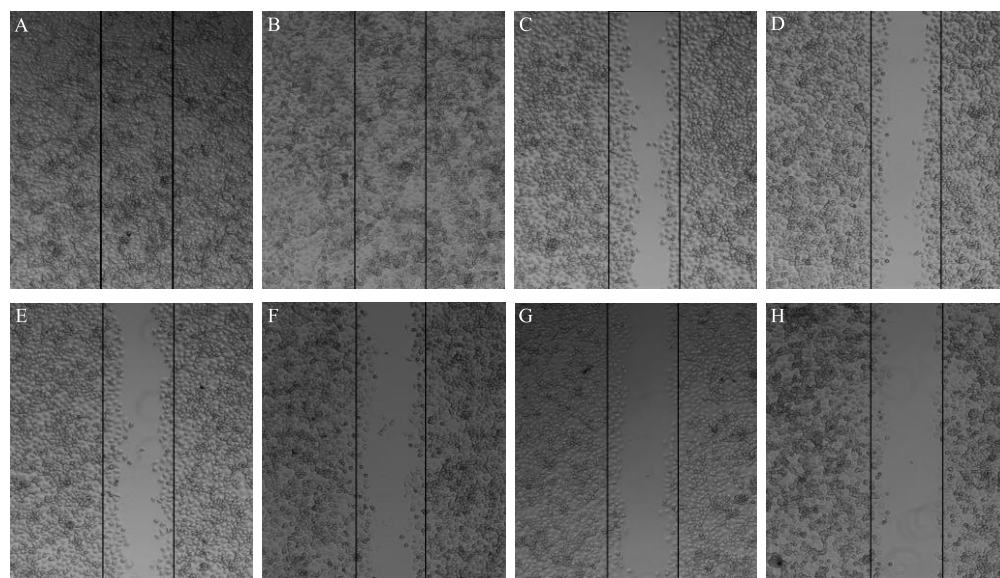


图 7 PCE/Cur NPs 对 B16 细胞迁移能力的影响

Fig. 7 Effect of PCE/Cur NPs on migration of B16 cells

细胞的迁移能力得到了明显的抑制。特别是质量浓度在 $16 \mu\text{g/mL}$ (H) 时, 显著地抑制了 B16 细胞的迁移能力, 抑制率达到 95.50% ($P < 0.05$), 而质量浓度在 $8 \mu\text{g/mL}$ (F)、 $12 \mu\text{g/mL}$ (G) 时, 抑制率分别为 90.30% 、 86.50% ($P < 0.05$), 也远远高于 Cur 混悬液的抑制率, 52.20% (C)、 72.30% (D) 与 78.30% (E) ($P < 0.05$), 未处理组与溶剂组几乎不影响迁移。结果表明 PCE/Cur NPs 对 B16 细胞的迁移能力的抑制作用优于原料药, 且呈现良好的量效关系。

3 讨论

本实验在原有材料 PCE 研究的基础上, 通过 PEI 链段上的氨基, 将 PEI 的胺基转化为 β -羧基酰胺, 得到带负电荷的酰胺化 PEI。通过热引发条件下自组装作用, 制备显示负电性的 PCE/Cur NPs, 该纳米粒子大小为 80 nm 左右, 大小均一, 分散性良好。分析原因可能是亲水性柔软链段 MPEG 的存在及所带电荷, 大大提高了 PCE/Cur NPs 在正常生理条件下的稳定性 (pH 约为 7.4 左右), 有效地阻止了纳米粒子的团聚。

酰胺键断裂具有环境响应性 (pH 依赖性), 利用肿瘤组织微环境的酸性条件下 (pH 值小于 6), 羧基酰胺基团自催化水解, 酰胺键断裂, 重新生成胺基, 使得载体带正电荷。这样就可以使纳米颗粒在正常组织中特别是血液中显负电性, 提高纳米粒子的血液稳定性, 延长纳米粒子在血液中的循环时间。而在肿瘤组织特别是在内涵体或溶酶体的酸性环境中, PCE/Cur NPs 水解断裂掉 1,2-环己二酸酐

显正电性, 使纳米颗粒在细胞内能够成功地实现电荷翻转为细胞内吞提供了有利条件。

载药量与包封率是衡量载体的重要指标, 本实验中, 通过改变投药量, 考察了不同配比制得的 PCE/Cur NPs。纳米粒子过 220 nm 的微孔滤膜, 去除未被包载进入的 Cur, 减小游离药物对实验结果的影响。发现材料与 Cur 的投料比为 $1:9$ 时, 两者达到最佳效果。

体外释放研究发现, PCE/Cur NPs 的释放具有缓控释的特征, 可维持稳定持久的释药浓度, 更好地发挥疗效。PCE/Cur NPs 抑制细胞的增殖与侵袭浸润具有浓度依赖性, 但是优于单纯的原料药。分析原因可能是 PCE/Cur NPs 不但解决了 Cur 的水不溶性, 同时分散性远远优于原料药, 更有利于细胞摄取, 进入细胞发挥作用。

参考文献

- [1] 常娜, 王巧侠, 王小平, 等. 姜黄素抗肿瘤机制的研究进展 [J]. 生物学杂志, 2018, 35(1): 97-100.
- [2] 李军, 熊琨, 龚元, 等. 基于信号转导通路的姜黄素抗氧化机制研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2373-2380.
- [3] 韩伟, 雷勇胜. 姜黄素治疗泌尿生殖系统癌症的作用机制研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(2): 260-264.
- [4] 胡晨, 汪玉馨, 孟长虹. 姜黄素下调 NF- κ B 信号通路抑制化学缺氧诱导的 U87 细胞炎症反应 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(11): 1989-1993.
- [5] 张军, 郭卫, 翟光喜. 姜黄素剂型的研究概况 [J].

- 食品与药品, 2010, 12(3): 133-136.
- [6] Aggarwal B B, Kumar A, Bharti A C. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(1A): 363-398.
- [7] 杨雪梅, 邱红梅, 田 蜜, 等. 姜黄素对人过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma 1$ 激活作用的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3122-3126.
- [8] 罗廷顺, 李洪文, 刘正文, 等. 姜黄素的提取分离与药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 102-107.
- [9] 常明向, 吴梅梅, 李瀚旻. 姜黄素与甘草次酸联用对肝癌 HepG-2 细胞增殖的抑制作用 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 42-47.
- [10] Notarbartolo M, Poma P, Perri D, *et al.* Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF- κ B activation levels and in IAP gene expression [J]. *Cancer Lett*, 2005, 224(1): 53-65.
- [11] 郭庆发, 周茂玲, 曹 慧. 共载姜黄素与阿霉素的聚乳酸-聚乙烯亚胺微球的制备及体外评价 [J]. 功能材料, 2017, 6(48): 6176-6182.
- [12] 孙锦贵, 卫 华. 姜黄素在肿瘤治疗中的应用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(5): 94.
- [13] Guo Q F, Li X L, Yang Y, *et al.* Enhanced 4T1 breast carcinoma anticancer activity by co-delivery of doxorubicin and curcumin with core-shell drug-carriers based on heparin modified poly(L-lactide) grafted polyethylenimine [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(2): 227-237.
- [14] 冉 娅, 张良珂. 难溶性药物姜黄素作为纳米晶稳定剂制备 Pickering 乳剂的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1773-1777.
- [15] 徐 艳, 张心怡, 狄留庆, 等. 热熔挤出技术制备热敏性姜黄素固体分散体的研究 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 4014-4021.
- [16] 杨艳梅, 赵丽艳, 王东晗, 等. 均匀设计法优化姜黄素 TPGS/F127/P123 混合胶束的处方工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1556-1561.
- [17] 刘举慧, 赵 峰, 周海玲, 等. 载姜黄素/阿霉素叶酸偶联壳聚糖纳米粒的制备 [J]. 科学技术与工程, 2018, 18(4): 239-244.
- [18] 徐骏军, 陈丹飞, 宋倩倩, 等. pH 值响应释药 As_2O_3 聚乙二醇-聚己内酯-聚乙烯亚胺纳米粒的制备及体外评价 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5532-5540.
- [19] Shi S, Zhu X C, Guo Q F, *et al.* Self-assembled mPEG-PCL-g-PEI micelles for simultaneous codelivery of chemotherapeutic drugs and DNA: Synthesis and characterization [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 1749-1759.
- [20] Guo Q F, Kuang L, Cao H *et al.* Self-assembled mPEG-PCL-PEI micelles for multifunctional nanoprobes of doxorubicin delivery and magnetic resonance imaging and optical imaging [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 136: 687-693.