

黄芩苷 PEG-PE 纳米胶束的制备、表征与细胞毒性研究^Δ

宁国庆^{1*}, 吴洁¹, 葛晨亮¹, 周定荣², 唐义信^{1#} (1. 南华大学附属第一医院心内科, 湖南衡阳 421001; 2. 中南大学湘雅二医院中心实验室, 长沙 410011)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)11-1487-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.11.10

摘要 目的: 制备黄芩苷(BAI)聚乙二醇衍生化磷脂酰乙醇胺(BAI@PEG-PE)纳米胶束, 并对其表征和细胞毒性研究。方法: 采用薄膜水化法制备BAI@PEG-PE纳米胶束, 观察其外观特征, 检测其粒径、多分散系数(PDI)、Zeta电位、载药量、包封率。比较BAI原料药和BAI@PEG-PE纳米胶束在pH 7.4磷酸盐缓冲液中1~84 h内的释药情况。以香豆素6为荧光探针, 观察PEG-PE纳米胶束在H9c2心肌细胞中的分布。将H9c2心肌细胞分为模型组、BAI原料药组和BAI@PEG-PE纳米胶束组, 用不含药或含相应药物的无血清DMEM培养液培养0.5 h后, 用异丙肾上腺素诱导心肌细胞凋亡, 比较3组细胞的细胞核形态变化、细胞凋亡率和凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)及其X蛋白(Bax)的蛋白表达水平。结果: 所制备的BAI@PEG-PE纳米胶束呈现大小比较均一的圆球形, 其粒径为(16.7±0.8) nm, PDI为0.11±0.01, Zeta电位为(-18.4±0.6) mV, 载药量为(7.84±0.65)%, 包封率为(85.7±4.9)% (n=3), 84 h的累积释放度为76.5%, 而BAI原料药在24 h内已基本释放完全。PEG-PE纳米胶束可增强H9c2心肌细胞对香豆素6的摄取, 且主要聚集在线粒体周围。与模型组比较, BAI原料药组和BAI@PEG-PE纳米胶束组细胞的凋亡形态明显改善, 凋亡率明显降低, Bcl-2蛋白表达明显增强, Bax蛋白表达水平明显降低, 差异均有统计学意义(P<0.05或P<0.01), 其中BAI@PEG-PE纳米胶束组的上述效果更明显(P<0.05或P<0.01)。结论: 成功制得BAI@PEG-PE纳米胶束, 其具有明显的缓释作用、心肌靶向性, 可预防心肌细胞的凋亡。

关键词 聚乙二醇衍生化磷脂酰乙醇胺; 纳米胶束; 黄芩苷; 体外释放; H9c2心肌细胞

Study on Preparation, Characterization and Cytotoxicity of Baicalin PEG-PE Nanomicelles

NING Guoqing¹, WU Jie¹, GE Chenliang¹, ZHOU Dingrong², TANG Yixin¹ (1. The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hunan Hengyang 421001, China; 2. Central Laboratory, Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Baicalin-loaded Polyethylene glycol-derivatized phosphatidylethanolamine (BAI@PEG-PE) nanomicelles, and to characterize it and study its cytotoxicity. METHODS: BAI@PEG-PE nanomicelles were prepared by film hydration method and their appearance characteristics were observed. The particle size, polydispersity index, Zeta potential, drug-loading amount and encapsulation efficiency of the nanomicelles were detected. Drug release of BAI raw material and BAI@PEG-PE nanomicelles in pH 7.4 phosphate buffer were compared within 1-84 h. Using coumarin 6 as fluorescent probe, the distribution of PEG-PE nanomicelles in H9c2 cardiomyocytes were observed. H9c2 cardiomyocytes were divided into model group, BAI raw material group and BAI@PEG-PE nanomicelles group. After treated with serum-free DMEM medium containing no or corresponding drugs for 0.5 h, isoproterenol was used to induce cardiomyocyte apoptosis. Nuclear morphology, cell apoptosis rate and protein expression of Bcl-2 and Bax were compared with among 3 groups. RESULTS: Prepared BAI@PEG-PE nanomicelles were uniform globular shape. The particle size was (16.7±0.8) nm, PDI was 0.11±0.01 and Zeta-potential was (-18.4±0.6) mV; drug-loading amount was (7.84±0.65)%, encapsulation efficiency was (85.7±4.9)% (n=3). Accumulative release rate was 76.5% within 84 h. BAI raw material was released completely within 24 h. PEG-PE nanomicelles could strengthen the intake of coumarin 6 in H9c2 cardiomyocytes, mainly gathering around mitochondria. Compared with model group, the apoptosis morphology of cardiomyocytes were improved significantly in BAI raw material group and BAI@PEG-PE nanomicelles group; apoptosis rate was decreased significantly; protein expression of Bcl-2 was increased significantly; protein expression of Bax was decreased significantly with statistical significance (P<0.05 or P<0.01). Above effects of BAI@PEG-PE nanomicelles group were more significant (P<0.05 or P<0.01). CONCLUSIONS: BAI@PEG-PE nanomicelles are prepared successfully, and show significant sustained-release effect and myocardial targeting, and can prevent cardiomyocyte apoptosis.

KEYWORDS Polyethylene glycol-derivatized phosphatidylethanolamine; Nanomicelles; Baicalin; Release *in vitro*; H9c2 cardiomyocyte

急性心肌梗死(Acute myocardial infarction, AMI)是

Δ 基金项目: 湖南省卫生计生委科研计划课题(No.20180059)

* 副主任医师。研究方向: 心血管药物的靶向治疗。E-mail: ningq_ok@126.com

通信作者: 副主任医师, 博士。研究方向: 心内科介入治疗。E-mail: tytangyixin2014@sina.com

内科常见的急症, 为冠心病中最凶险的一种^[1]。心肌梗死早期及时恢复冠脉血流是挽救AMI患者的根本措施, 但随之诱发的心肌缺血再灌注(Ischemia reperfusion, IR)损伤, 可能会进一步扩大心肌梗死面积。目前研究证实, 心肌IR损伤机制主要表现为线粒体功能紊乱, 从而引发心肌细胞出现大量凋亡和自噬^[2-3], 因此, 恢复线

粒体的正常功能对于减轻心肌IR损伤具有重大临床研究价值。目前,治疗AMI的药物很难滞留在缺血心肌部位,加之细胞膜屏障的阻碍,细胞摄取量少,到达线粒体效应靶点的药物量微乎其微,故需采用大剂量给药,但大剂量药物又可能诱发非靶向部位的药物蓄积,导致不良反应的发生。因此构建一种新型载药系统,增加药物在心肌细胞内的摄取量,尽量将药物传递到线粒体,对于减少心肌细胞凋亡具有非常重要的科学研究价值。

黄芩苷(Baicalin, BAI)是从中药黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georigi)的干燥根中提取的一种黄酮类成分,在心脑血管方面具有改善心肌IR损伤、改善脑组织损伤和抗心律失常等多种作用^[4]。Wang XB等^[5]研究发现,BAI预处理能够抑制线粒体损伤介导的凋亡,减少心肌IR损伤。但BAI存在亲水性和亲油性均较差、体内半衰期短等成药性问题^[6-7]。聚乙二醇衍生化磷脂酰乙醇胺(Polyethylene glycol-derivatized phosphatidylethanolamine, PEG-PE)是体内可降解并经美国FDA批准的可用于人体的药物载体材料,常用于增加难溶性药物的溶解度和提高药物在体内的靶向分布。有研究报道,PEG-PE纳米胶束在缺血心肌部位具有很好的渗透与滞留(Enhanced permeability and retention time, EPR)效应,能将药物蓄积于缺血心肌部位,具有良好的心脏靶向性;PEG-PE纳米胶束还可以促进药物的跨膜转运,有助于将药物递送到亚细胞器效应部位^[8-9]。因此,笔者以PEG-PE纳米胶束为载体,制备了BAI@PEG-PE纳米胶束,并对其表征和细胞毒性研究,以期为AMI的治疗提供新的选择药物。

1 材料

1.1 仪器

Zetasizer Nano ZS纳米粒度电位仪(英国马尔文公司);Agilent 1200高效液相色谱(HPLC)仪(美国安捷伦公司);Eyelan-1001旋转蒸发器(亚宏科技有限公司);VL2000DX-SVF17SP激光扫描共聚焦显微镜(日本Lasertech公司);BT25S电子分析天平(南京莱步科技实业有限公司);TGL-16M台式离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);JEM-2100透射电镜(日本电子株式会社)。

1.2 药品与试剂

BAI原料药(成都锐可生物科技有限公司,批号:180522,纯度:≥98%);BAI对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110715-201117,供含量测定用,纯度:≥98%);PEG-PE(上海芑圣生物科技有限公司,批号:20190216);香豆素6(C6,百灵威科技有限公司,批号:72609-201714,纯度:≥98%);氯化硝基四氮唑蓝(NBT,上海如吉生物科技有限公司);线粒体红色荧光探针(MitoTracker™ Red)、细胞核染料Hoechst 33342均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;兔抗鼠B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)及其X蛋白(Bax)单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)小鼠源单克隆抗体和二抗(艾美捷科有限公司);4',6-二

脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染料(苏州宇恒生物科技有限公司);异丙肾上腺素(ISO,上海伊卡生物技术有限公司);甲醇(美国Thermo Fisher试剂公司,色谱纯)。

1.3 细胞

H9c2心肌细胞株购自南京科佰生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 BAI@PEG-PE纳米胶束的制备

精密称取BAI 10 mg、PEG-PE 40 mg置于旋蒸瓶中,加入甲醇约50 mL促使其完全溶解,通入氩气进行保护,调节转速为50~120 r/min,由快至慢,旋转蒸发形成一层均匀干燥薄膜,再将旋蒸瓶置于冰水浴中,抽真空干燥约10 h除去残留有机溶剂,加入pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)约5 mL,促使薄膜水合,再于40 ℃水浴下水化60 min,再超声(频率:40 Hz,功率:120 W)10 min,室温下放置1 h,经0.22 μm微孔滤膜过滤4~5次除去沉淀物,再真空冷冻干燥24 h,制得BAI@PEG-PE纳米胶束冻干粉。

2.2 BAI@PEG-PE纳米胶束的外观特征

称取适量BAI@PEG-PE纳米胶束冻干粉,加入蒸馏水,超声(频率:40 Hz,功率:120 W)5 min使粒子分散均匀,取少量滴加在200目铜网上,再用滤纸吸走多余的液体,室温烘干,使用透射电镜观察BAI@PEG-PE纳米胶束的外观特征。BAI@PEG-PE纳米胶束的透射电镜图见图1。

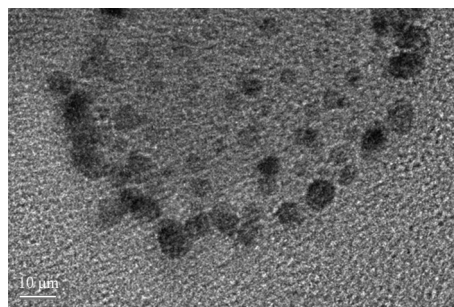


图1 BAI@PEG-PE纳米胶束的透射电镜图

Fig 1 TEM of BAI@PEG-PE nanomicelles

由图1显示,BAI@PEG-PE纳米胶束呈现大小比较均一的圆球形。

2.3 BAI@PEG-PE纳米胶束的表征

称取适量BAI@PEG-PE纳米胶束冻干粉,加入蒸馏水,超声(频率:40 Hz,功率:120 W)5 min使粒子分散均匀,使用Zetasizer Nano ZS纳米粒度电位仪检测胶束的粒径分布、多分散系数(PDI)和Zeta电位。结果显示,BAI@PEG-PE纳米胶束的粒径为 (16.7 ± 0.8) nm, PDI为 0.11 ± 0.01 , Zeta电位为 (-18.4 ± 0.6) mV($n=3$),粒径分布图见图2, Zeta电位分布图见图3。

比较图1和图2结果发现,图2中BAI@PEG-PE纳米胶束的粒径明显大于图1显示的结果,这可能与Zetasizer Nano ZS纳米粒度电位仪检测的是水合粒径有关。

2.4 BAI@PEG-PE纳米胶束的封装率与载药量

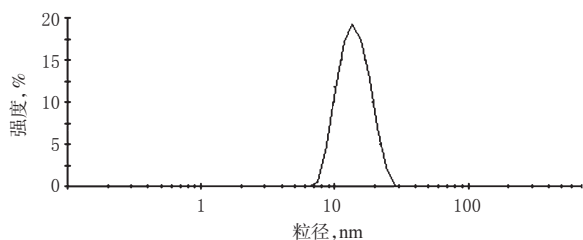


图2 BAI@PEG-PE 纳米胶束的粒径分布图

Fig 2 Distribution of particle size of BAI@PEG-PE nanomicelles

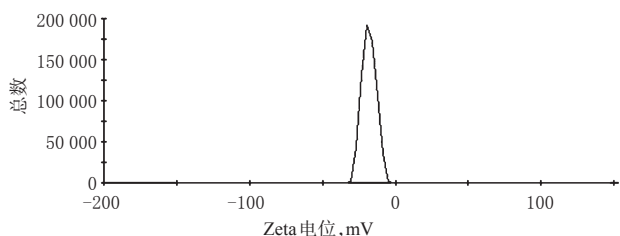


图3 BAI@PEG-PE 纳米胶束的 Zeta 电位分布图

Fig 3 Distribution of Zeta-potential of BAI@PEG-PE nanomicelles

2.4.1 BAI的含量测定 参照2015年版《中国药典》(一部)黄芩下BAI的含量测定方法^[10],以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,甲醇-水-磷酸(47:53:0.2, V/V/V)为流动相,检测波长为280 nm,进样量为10 μL,理论板数按BAI峰计应不低于2 500。方法验证结果显示,BAI检测质量浓度的线性范围为20~80 μg/mL($r=0.9999$),精密性、稳定性试验中峰面积的RSD<1%($n=3$),平均加样回收率为99.8%($n=3$),该方法符合相关标准。

2.4.2 包封率与载药量 取BAI@PEG-PE纳米胶束溶液500 μL,置于超滤离心管中,低温下10 000 r/min离心5 min,取离心管内的BAI@PEG-PE纳米胶束溶液,冷冻干燥后称质量,记为 $m_{总}$,然后加入10倍体积量的甲醇破坏纳米胶束结构,检测其中BAI质量,记为 m_0 ;离心管外为游离BAI,测定游离BAI质量,记为 m_1 ,计算BAI@PEG-PE纳米胶束的包封率(EE,%)和载药量(DL,%)。EE= $m_0/(m_1+m_0) \times 100\%$, DL= $m_0/m_{总} \times 100\%$ 。结果显示,BAI@PEG-PE纳米胶束的包封率为(85.7±4.9)%,载药量为(7.84±0.65)%($n=3$)。

2.5 BAI@PEG-PE 纳米胶束的稳定性

将BAI@PEG-PE纳米胶束置于4℃的冰箱中放置2个月后检测该胶束的粒径、Zeta电位、载药量和包封率。结果显示,放置2个月后BAI@PEG-PE纳米胶束的粒径为(17.4±1.6) nm、Zeta电位为(-20.4±0.7) mV、载药量为(8.06±0.37)%,包封率为(83.7±5.4)%,与放置前初始结果相差不大,故BAI@PEG-PE纳米胶束在4℃下放置2个月的稳定性良好。

2.6 BAI@PEG-PE 纳米胶束的体外释放

将BAI原料药(100 μg)和BAI@PEG-PE纳米胶束(含100 μg BAI)装入透析袋(截留分子量为3 000)中,两端采用夹子封闭,置于200 mL pH 7.4的PBS中,设定水

温为37℃。分别于1、3、6、9、12、16、20、24、36、48、60、72、84 h取样,取样体积为300 μL,取样同时补充等温等量的pH 7.4的PBS。参照2015年版《中国药典》(一部)黄芩下BAI的含量测定方法^[10]检测各时间点取样液中的BAI含量,计算BAI@PEG-PE纳米胶束的累积释放度(Q),绘制体外释放曲线。BAI原料药和BAI@PEG-PE纳米胶束的体外释放曲线见图4。

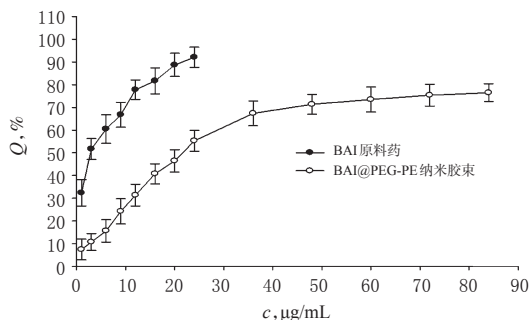


图4 BAI原料药和BAI@PEG-PE 纳米胶束的体外释放曲线

Fig 4 Release curve *in vitro* of BAI raw material and BAI@PEG-PE nanomicelles

由图4可知,BAI在24 h内已经释放达到92.1%,基本上释放完全,而BAI@PEG-PE纳米胶束有明显的缓释作用,84 h的累积释放度仅为76.5%。

2.7 H9c2 心肌细胞摄取

考虑到BAI自身无荧光,故采用带绿色荧光的C6为荧光探针,按BAI@PEG-PE纳米胶束的制备方法,采用薄膜水化法,将C6包埋于PEG-PE纳米胶束亲脂性内核中,即可获得带绿色荧光的C6@PEG-PE纳米胶束。将H9c2心肌细胞接种到12孔培养板中,细胞密度为 1.0×10^5 个/孔,培养24 h。然后将C6@PEG-PE纳米胶束或者C6分别与H9c2心肌细胞共同孵育,C6的质量浓度为100 ng/mL,孵育4 h后,采用线粒体红色荧光探针染色,最后采用少量pH 7.4的PBS洗涤细胞数次,尽量清除细胞外残留的荧光物质,最后采用激光扫描共聚焦显微镜观察荧光物质在细胞内的分布情况。激光扫描共聚焦图见图5。

由图5显示,C6有少量进入H9c2心肌细胞内,并与线粒体重合,显示黄色,与文献[11-12]报道一致,其可能的原因是亲脂性C6在亲水性细胞液中跨膜转运相对困难,因此摄取进入细胞内的量相对较少。与C6比较,C6@PEG-PE纳米胶束进入H9c2心肌细胞内的量明显较多,且大量与红色的线粒体部位重合。由此可见,PEG-PE纳米胶束不仅能显著增强C6的水溶性,还可能诱导H9c2心肌细胞形成临时性的孔道,便于C6跨膜转运进入细胞。提示PEG-PE纳米胶束能显著增加药物的H9c2心肌细胞摄取量,并使药物聚集在线粒体部位。

2.8 体外细胞凋亡试验

2.8.1 细胞处理与分组 将H9c2心肌细胞接种到12孔培养板中,细胞密度为 1.0×10^5 个/孔,培养24 h后随机分

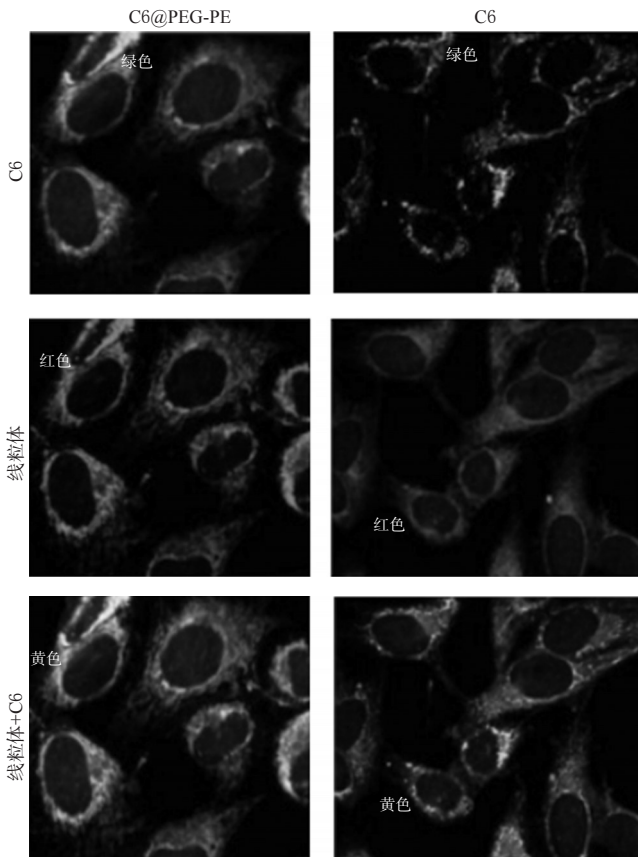


图5 激光扫描共聚焦图($\times 500$)

Fig 5 Laser scanning confocal map($\times 500$)

为模型组、BAI原料药组和BAI@PEG-PE纳米胶束组。模型组参照文献报道方法^[13-14],以无血清DMEM培养液加入ISO 10 $\mu\text{mol/L}$ 与H9c2心肌细胞共同孵育24 h复制心肌细胞凋亡模型;BAI原料药组细胞先在培养基中加入30 $\mu\text{mol/L}$ BAI原料药预处理0.5 h,再加入ISO 10 $\mu\text{mol/L}$ 共同孵育24 h;BAI@PEG-PE纳米胶束组细胞先在培养基中加入30 $\mu\text{mol/L}$ BAI@PEG-PE纳米胶束预处理0.5 h,再加入ISO 10 $\mu\text{mol/L}$ 作用24 h。

2.8.2 Hoechst染色观察凋亡细胞数量 取H9c2心肌细胞,按“2.7.1”项下方法分组培养后,用4%甲醛溶液固定,再以PBS洗涤数次,用DAPI对细胞核进行染色,再采用荧光显微镜观察细胞核的形态变化,统计凋亡率。各组细胞Hoechst染色图见图6(图中 \blacktriangleright 所指为蓝色光斑),细胞凋亡率的测定结果见图7。

由图6和图7显示,模型组细胞出现了明显的暗淡、皱缩,碎裂的且呈明亮蓝色的细胞为凋亡细胞。BAI原料药组和BAI@PEG-PE纳米胶束组的凋亡细胞显著少于模型组($P < 0.01$),其中BAI@PEG-PE纳米胶束组的凋亡细胞最少($P < 0.01$)。表明BAI@PEG-PE纳米胶束的抗心肌细胞凋亡效果作用优于BAI原料药。

2.8.3 Western blot法检测细胞内Bax、Bcl-2蛋白表达 采用Western blot法检测细胞中凋亡相关Bax、Bcl-2蛋白的表达。取H9c2心肌细胞,按“2.7.1”项下方法分组培养后,提取总蛋白,定量,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺

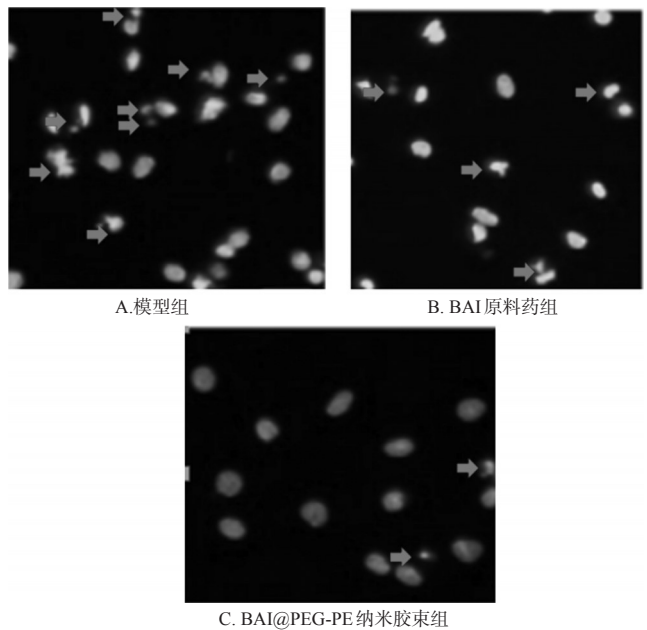
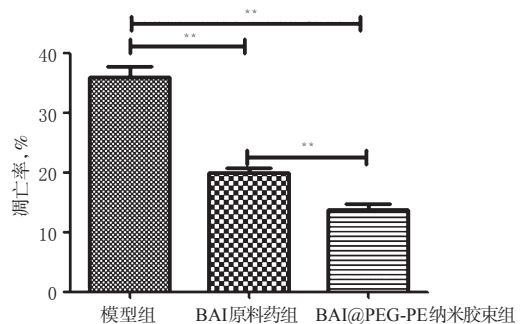


图6 各组细胞Hoechst染色图($\times 300$)

Fig 6 Hoechst staining of cell in each group($\times 300$)



注: ** $P < 0.01$

Note: ** $P < 0.01$

图7 各组细胞凋亡率的测定结果

Fig 7 Apoptosis rate of cell in each group

凝胶电泳(SDS-PAGE)后,转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜中,封闭,加入兔抗鼠Bcl-2(稀释比例:1:1 000)、Bax(稀释比例:1:1 000)单克隆抗体孵育后,用TBST缓冲液清洗,再加入二抗进行孵育,次日TBST缓冲液洗膜,用增强化学发光(ECL)检测液显影定影后,用Image J软件进行灰度分析。以目标蛋白与内参GAPDH的比值进行评价,采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。各组细胞Bcl-2、Bax蛋白表达的电泳图见图8,蛋白表达测定结果见图9。

由图8和图9显示,与模型组比较,BAI原料药组和BAI@PEG-PE纳米胶束组细胞中Bcl-2蛋白表达明显增强,Bax蛋白表达水平明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中BAI@PEG-PE纳米胶束组的上述效果强于BAI原料药组($P < 0.05$)。

3 讨论

PEG-PE的外壳PEG具有良好的水溶性、生物相容性和无免疫原性,可以减弱体内免疫系统如肝脾网状内皮系统的特异性识别功能,加之其大分子尺寸结构,不

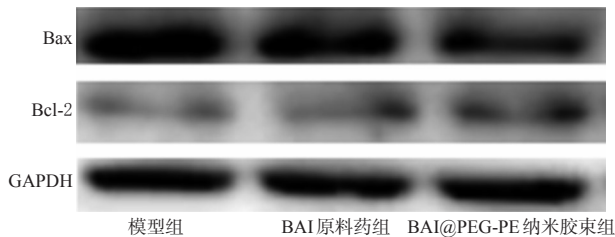
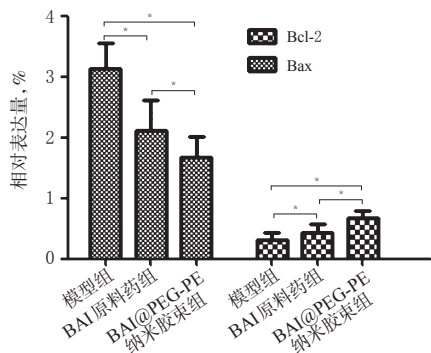


图8 各组细胞Bcl-2、Bax蛋白表达的电泳图

Fig 8 Electrophoretogram of protein expression of Bcl-2 and Bax of cell in each group



注: * $P < 0.05$

Note: * $P < 0.05$

图9 各组细胞Bcl-2、Bax蛋白表达的测定结果

Fig 9 Protein expression of Bcl-2 and Bax of cell in each group

易被肾小球滤过,故在体内可以长循环,从而延长药物的体内作用时间^[15]。内核PE具有良好的亲脂性,BAI属于难溶于水的黄酮类成分,具有一定的疏水性,恰好可以融合在疏水性内核PE中。本研究以PEG-PE纳米胶束为载体材料,将难溶性BAI包埋在胶束内核中,表征结果显示BAI@PEG-PE纳米胶束具有粒径小、包封率及载药量高等优良特点。体外释放结果表明,BAI@PEG-PE纳米胶束在初期24 h释放较快,突释主要是由于胶束表面吸附或不完全包埋药物迅速释放的结果,24 h后释药比较相对缓慢,缓释是由于药物被PEG-PE纳米胶束包埋于内核中,与亲脂性内核PE完全融合在一起,较难解离释放,这样一来可以减少药物在体内循环过程中的损失,从而将更多的药物输送到有效部位。

本试验以具有绿色荧光的C6为探针,制备成C6@PEG-PE纳米胶束,与C6相比,结果显示H9c2心肌细胞摄取C6@PEG-PE纳米胶束的量显著增加,且进入细胞后还能富集在心肌细胞线粒体周围,这样有助于药物在该细胞器部位发挥疗效。心肌细胞凋亡试验结果显示,BAI@PEG-PE纳米胶束可以明显降低细胞凋亡率,还能显著抑制促凋亡蛋白Bax的表达,提高抗凋亡蛋白Bcl-2表达,进一步可以推测PEG-PE纳米胶束可以增加BAI在细胞内的摄取量,还能有助于递送BAI至线粒体部位,故抗心肌细胞凋亡作用显著强于BAI原料药。

综上所述,BAI@PEG-PE纳米胶束具有粒径小、高包封率、缓慢释药等优势,还能促进BAI的心肌细胞摄

取,并聚集在线粒体部位,显著提高药物的抗心肌细胞凋亡作用。

参考文献

- [1] WHO. *Causes of death 2008 summary tables*[EB/OL]. [2018-12-02].http://www.360doc.com/content/13/0726/13/3415188_302588420.shtml.
- [2] HUANG ZQ, YE BZ, DAI ZY, et al. Curcumin inhibits autophagy and apoptosis in hypoxia/reoxygenation-induced myocytes[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6): 4678-4684.
- [3] JIAN J, XUAN FF, QIN FZ, et al. Bauhinia championii flavone inhibits apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015. DOI: 10.2147/DDDT.S92549.
- [4] 纪相福,史道华.黄芩苷的心脑血管作用研究进展[J]. *海峡药学*, 2006, 18(5): 10-12.
- [5] WANG XB, HE F, LIAO YL, et al. Baicalin pretreatment protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting mitochondrial damage-mediated apoptosis[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(4): 4343-4345.
- [6] 马文转,王金铃,屠鹏飞.黄芩苷纳米胶束的制备、表征及其对MCF-7细胞抑制作用的研究[J]. *中草药*, 2015, 46(4): 507-512.
- [7] 吴玉梅,李新悦,张谦,等.单克隆抗体OX26修饰的丹酚酸B/黄芩苷纳米结构脂质载体研究[J]. *中草药*, 2018, 49(12): 2801-2808.
- [8] LUKYANOV AN, HARTNER WC, TORCHILIN VP. Increased accumulation of PEG-PLGA micelles in the area of experimental myocardial infarction in rabbits[J]. *J Control Release*, 2004, 94(1): 187-193.
- [9] XIA CF, YE ZG, ZHOU XN, et al. Tissue distribution of PEGylated puerarin in acute myocardial ischemia model rats[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, 49(10): 1413-1417.
- [10] 国家药典委员会. *中华人民共和国药典:一部*[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社, 2015: 301.
- [11] RIVOLTA I, PANARITI A, LETTIERO B, et al. Cellular uptake of coumarin-6 as a model drug loaded in solid lipid nanoparticles[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2011, 62(1): 45-53.
- [12] HU X, YANG FF, LIU CY, et al. In vitro uptake and transport studies of PEG-PLGA polymeric micelles in respiratory epithelial cells[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 114: 29-37.
- [13] 赵慧,王雄,魏晓倩.异丙肾上腺素预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及氧化应激的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2017, 15(1): 36-40.
- [14] 蔡少艾,赵甘剑,黄尹,等.血管紧张素(1-7)抑制异丙肾上腺素诱导的H9c2心肌细胞凋亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(5): 438-444.
- [15] 王琳,陆丹玉,方晨.去甲斑蝥素纳米胶束的制备及抑瘤作用研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(19): 2680-2684.

(收稿日期:2019-01-29 修回日期:2019-04-29)

(编辑:邹丽娟)