

# 载阿霉素红细胞膜壳聚糖靶向纳米粒的制备及评价<sup>△</sup>

洪伟勇<sup>1,2\*</sup>, 周旭晖<sup>2</sup>, 金陈浩<sup>2</sup>, 王金明<sup>1</sup>, 郭纺元<sup>2</sup>, 杨根生<sup>2#</sup>(1. 台州学院附属市立医院药剂科, 浙江台州 318000; 2. 浙江工业大学药学院, 杭州 310032)

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)13-1594-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.13.10



**摘要** 目的 制备靶向肿瘤细胞叶酸(FA)受体的载阿霉素红细胞膜壳聚糖靶向纳米粒(FA-RBC-DOX-CS-NPs), 并进行评价。方法 采用离子交联法制备载阿霉素壳聚糖纳米粒(DOX-CS-NPs), 将FA和氨基聚乙二醇磷脂(NH<sub>2</sub>-PEG2000-DSPE)通过共价连接后修饰红细胞膜, 然后构建FA-RBC-DOX-CS-NPs, 并对其表征, 考察其体外释药特性、抗肿瘤活性、入胞能力(以人乳腺癌MCF-7细胞进行考察)。结果 FA-RBC-DOX-CS-NPs平均粒径为(254.200±2.651) nm, 多分散性指数为0.199±0.031, Zeta电位为(-10.100±0.213) mV; 其在肿瘤微环境(pH6.5)中的释放速率较快。细胞实验表明, 该纳米粒可抑制MCF-7细胞的增殖活力, 且可提高药物的入胞效率。结论 本研究成功制备了FA-RBC-DOX-CS-NPs。该纳米粒具有较好的肿瘤细胞靶向性和入胞能力, 可实现药物在肿瘤细胞内富集。

**关键词** 红细胞膜; 纳米粒; 叶酸受体; 靶向给药系统; 抗肿瘤

## Preparation and evaluation of doxorubicin-loaded red blood cell membrane chitosan-targeted nanoparticles

HONG Weiyong<sup>1,2</sup>, ZHOU Xuhui<sup>2</sup>, JIN Chenhao<sup>2</sup>, WANG Jinming<sup>1</sup>, GUO Fangyuan<sup>2</sup>, YANG Gensheng<sup>2</sup>(1. Dept. of Pharmacy, Taizhou Municipal Hospital Affiliated to Taizhou University, Zhejiang Taizhou 318000, China; 2. School of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To prepare and evaluate doxorubicin-loaded red blood cell membrane chitosan-targeted nanoparticles of targeting tumor cell folate acid (FA) receptor (FA-RBC-DOX-CS-NPs). **METHODS** Doxorubicin-loaded chitosan nanoparticles (DOX-CS-NPs) were prepared by ion cross-linking method. FA and amino polyethylene glycol phospholipin (NH<sub>2</sub>-PEG2000-DSPE) were covalently linked to modify the red blood cell membrane to construct FA-RBC-DOX-CS-NPs. FA-RBC-DOX-CS-NPs were characterized and investigated on *in vitro* drug release characteristics, antitumor activity and endocytosis ability (investigation with human breast cancer MCF-7 cells). **RESULTS** Average particle size of FA-RBC-DOX-CS-NPs was (254.200 ± 2.651) nm, and polydispersity index was 0.199 ± 0.031; Zeta potential was (-10.100 ± 0.213) mV. FA-RBC-DOX-CS-NPs released fast in the tumor microenvironment (pH6.5). Cellular experiments showed that, the nanoparticles could inhibit the activity of MCF-7 cell proliferation and improve the efficiency of endocytosis. **CONCLUSIONS** FA-RBC-DOX-CS-NPs are prepared successfully. The nanoparticles have good tumor cell targeting and endocytosis ability, and can realize the enrichment of drugs in tumor cells.

**KEYWORDS** red blood cell membrane; nanoparticles; folic acid receptor; targeted drug delivery system; anti-tumor

恶性肿瘤严重威胁人类健康, 化学药物治疗仍是目前主要的治疗手段之一。阿霉素(doxorubicin, DOX)是最常用的化学治疗药物, 对乳腺癌、肺癌、膀胱癌等具有较明显的抗肿瘤作用, 是多种肿瘤的一线化疗药物; 但其具有骨髓抑制、心脏毒性、耐药性等缺点, 从而限制

了其临床应用<sup>[1]</sup>。红细胞是血液中数量最多、寿命最长的细胞, 也是运送氧气的主要媒介<sup>[2]</sup>; 其作为内源性物质, 具有极强的流动可塑性、高生物相容性、可生物降解性、超长的半衰期和低免疫原性等优点<sup>[3-6]</sup>; 通过修饰还可以将其构建成靶向肿瘤的药物递送系统<sup>[7-9]</sup>, 现已成为抗肿瘤药物研发的一个新热点。叶酸(folic acid, FA)受体是公认的肿瘤细胞生物标志物, 在大量肿瘤(特别是乳腺癌、宫颈癌、肝癌等多种实体瘤)中过表达<sup>[7, 10]</sup>, 而在正常细胞中很少表达, 是理想的靶向药物递送受体<sup>[11-12]</sup>。

基于此, 本研究以DOX为模型药物, 壳聚糖为载体

<sup>△</sup> 基金项目 浙江省自然科学基金资助项目(No.LY19B060012); 2017年浙江省药学会医院药学专项科研资助项目(No.2017ZYY28); 2019年浙江省药学会医院药学专项科研资助项目(No.2019ZYY44)

\* 第一作者 副主任药师, 博士研究生。研究方向: 药物新剂型、临床药学。电话: 0576-88858266。E-mail: weiyongh@126.com

# 通信作者 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 药物新剂型与新技术。电话: 0571-88871077。E-mail: yanggs@zjut.edu.cn

材料,采用离子交换法制备载阿霉素壳聚糖纳米粒(DOX-CS-NPs),将FA和氨基聚乙二醇磷脂(NH<sub>2</sub>-PEG2000-DSPE)通过共价连接后修饰红细胞膜(RBC),并构建靶向肿瘤细胞FA受体的载阿霉素红细胞膜壳聚糖靶向纳米粒(FA-RBC-DOX-CS-NPs),考察该纳米粒的理化性质和体外释药特性,并评价其抗肿瘤活性,以期DOX的新制剂开发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有IL-161CT型CO<sub>2</sub>培养箱[施都凯仪器设备有限公司(上海)有限公司],Malvern ZS90型激光纳米粒径仪(英国马尔文仪器有限公司),Nicolet 6700型傅里叶变换红外光谱仪、Fresco 21型高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司),ELx800型酶标仪(美国BioTek公司),UV-2102型紫外可见分光光度计(美国Unocal公司),LSM 900型共聚焦显微镜(德国Carl Zeiss公司),X'pert PRO型X射线衍射仪(荷兰PANalytical公司),AVANCE-III型核磁共振波谱仪(德国Bruker公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

FA、壳聚糖和三聚磷酸钠(批号分别为20180607、20181009、201812110)购于上海阿拉丁生化科技有限公司;NH<sub>2</sub>-PEG2000-DSPE(批号20181022)购于上海凡硕生物科技有限公司;DOX(批号20180809)购于武汉远成共创科技有限公司;DMEM高糖培养基(批号19126245)购于美国Sigma公司;MTT试剂(批号2002316)购于北京索莱宝科技有限公司;DAPI染色液(批号20191116)购于上海颖心实验室设备有限公司;1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC,批号20180928)购于浙江普康化工有限公司;N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,批号20180821)购于上海麦克林生化科技有限公司;其余试剂为实验室常用规格,水为纯净水。

### 1.3 细胞

人乳腺癌MCF-7细胞购于上海生命科学研究所以细胞资源库。

### 1.4 动物

本研究所用动物为健康雄性SD大鼠,共9只,体重为180~200 g,鼠龄为8周,由浙江省医学科学院提供,动物生产许可证号为SCXK(浙)2019-0002。实验期间正常光照,动物饲养室环境温度为20~22℃,相对湿度为55%~60%,大鼠自由饮水采食。

## 2 方法

### 2.1 叶酸氨基聚乙二醇磷脂的合成

取7.94 mg FA溶于10 mL无水二甲基亚砜(DMSO)中,加入6.9 mg EDC和4.14 mg NHS,室温避光活化4 h,加入30 mg NH<sub>2</sub>-PEG2000-DSPE,避光,室温反应24 h(具体合成路线见图1),然后置于去离子水中透析(透析袋截留相对分子质量为3 000 Da)36 h,收集产物并冻干,即得叶酸氨基聚乙二醇磷脂(FA-PEG2000-DSPE)。采用核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)表征FA、NH<sub>2</sub>-PEG2000-DSPE和FA-PEG2000-DSPE的结构。

### 2.2 RBC的制备

取SD雄性大鼠血液,加入10倍体积的1×磷酸盐缓冲液(PBS),于4℃下以4 500 r/min离心10 min,取沉淀,以1×PBS洗涤3次,即得红细胞。将红细胞置于4倍体积的0.25×PBS中,于4℃下低渗处理40 min,以释放红细胞内容物;再以8 000 r/min离心15 min,取沉淀,以0.25×PBS洗涤2次,即得粉色的RBC,备用。

### 2.3 FA修饰RBC的表征

取“2.1”项下FA-PEG2000-DSPE适量,以1×PBS配制成质量浓度为50 μg/mL的溶液(2 mL),加至等体积RBC溶液中,置于37℃、100 r/min摇床上避光孵育1 h;再于4℃条件下用1×PBS洗涤离心(8 000 r/min)2次,即得FA修饰的RBC(FA-RBC)。采用傅里叶变换红外光

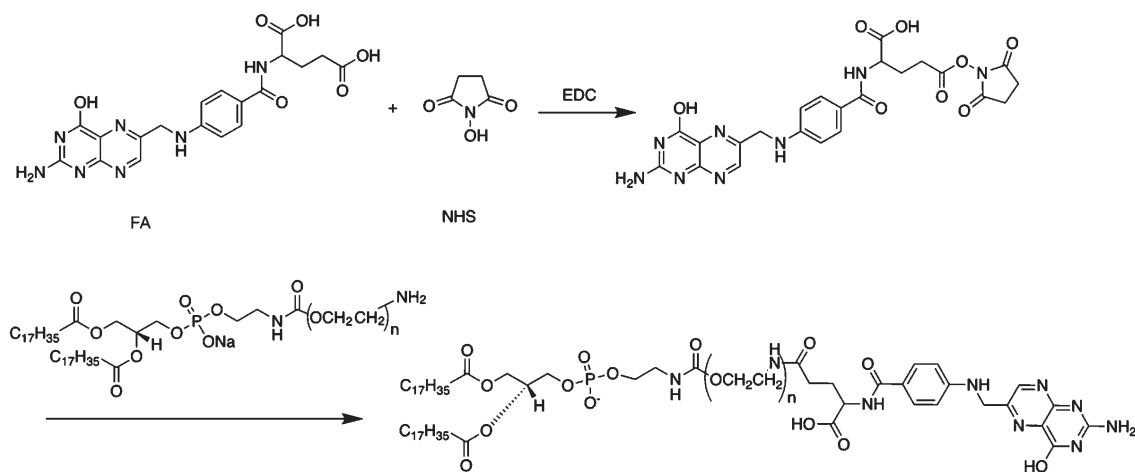


图1 FA-PEG2000-DSPE的合成路线

谱仪测定RBC和FA-RBC的结构。

## 2.4 DOX-CS-NPs的制备与表征

采用离子交联法制备DOX-CS-NPs<sup>[13]</sup>。在25℃、400 r/min的磁力搅拌下,于壳聚糖醋酸溶液(pH6.0)中加入DOX溶液,缓慢滴加三聚磷酸钠溶液至产生乳光,继续磁力搅拌10 min得纳米粒混悬液;将纳米粒混悬液置于超滤管(100 kDa)中离心(4 000 r/min),即得DOX-CS-NPs。其中,DOX溶液、壳聚糖醋酸溶液、三聚磷酸钠溶液的质量浓度分别0.5、1.5、0.4 mg/mL,体积比为5:5:4。采用激光纳米粒径仪测定该纳米粒的粒径、多分散性指数(polydispersity index, PDI)和Zeta电位。

## 2.5 DOX-CS-NPs包封率和载药量的测定

取适量DOX(质量记为M)按“2.4”项下方法制备纳米粒混悬液并超滤,取下清液,采用紫外可见分光光度计测定其中DOX含量(记为M<sub>1</sub>)<sup>[14]</sup>。取超滤膜上纳米粒,冻干,称质量(记为M<sub>2</sub>)。计算包封率和载药量,具体公式如下:包封率(%)=(M-M<sub>1</sub>)/M×100%,载药量(%)=(M-M<sub>1</sub>)/M<sub>2</sub>×100%。

## 2.6 FA-RBC-DOX-CS-NPs的制备及表征

采用细胞破碎仪处理FA-RBC(功率100 W,先破碎4 s,间隔5 s后,再破碎5 s),将破碎后的FA-RBC和DOX-CS-NPs经400 nm聚碳酸酯膜挤压3次后,再经200 nm聚碳酸酯膜挤压5次,即得FA-RBC-DOX-CS-NPs。采用激光纳米粒径仪测定其粒径、PDI和Zeta电位。

## 2.7 体外释放特性考察

分别取适量DOX、DOX-CS-NPs、FA-RBC-DOX-CS-NPs置于不同透析袋中,再将各透析袋分别置于pH 7.4(模拟体循环环境)和pH6.5(模拟肿瘤微环境)的PBS溶液(释放介质)中,于37℃、100 r/min摇床上进行透析。在预定的时间点(1、2、4、8、12、24、48、72 h),取出10 mL释放介质并补充等量新鲜介质,按“2.5”项下紫外分光光度法测定取出的释放介质中DOX的含量,并计算累积释放率。

## 2.8 体外抗肿瘤活性考察

取对数生长期的MCF-7细胞,以1×10<sup>4</sup>个/孔接种至96孔板中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养24 h后,弃去原培养基,分别加入含DOX、DOX-CS-NPs、FA-RBC-DOX-CS-NPs的培养基(以DOX计,质量浓度分别为0.001、0.010、0.100、0.500、1.000、5.000 μg/mL),每孔100 μL,各浓度平行5份;另设对照组(只加细胞不加药物)。培养48 h后,加入10 μL MTT(5 mg/mL),继续培养4 h;吸出培养基,加入DMSO 150 μL,采用酶标仪于570 nm波长处测定各孔光密度(optical density, OD)值,并计算细胞存活率,细胞存活率(%)=(给药组平均OD值/对照组平均OD值)×100%。

## 2.9 细胞摄取实验

取对数生长期的MCF-7细胞,以1×10<sup>4</sup>个/孔接种至96孔板中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养24 h后,弃去原培养基,分别加入含DOX、FA-RBC-DOX-CS-NPs和FA+FA-RBC-DOX-CS-NPs(游离FA用于封闭受体以验证纳米粒的入胞作用是否由FA受体介导)的新鲜培养基(以DOX计,质量浓度均为5 μg/mL);另设不加药物的空白组。于培养1、4 h时移除培养基,以4%多聚甲醛固定30 min;以PBS洗涤后,用10 μg/mL的DAPI染色1 h,采用共聚焦显微镜观察细胞的摄取情况。

## 3 结果与分析

### 3.1 FA-PEG2000-DSPE的合成结果

FA、NH<sub>2</sub>-PEG2000-DSPE和FA-PEG2000-DSPE的<sup>1</sup>H-NMR如图2~图4所示。对比图谱可知,图4中7.73~7.55 ppm(e)和6.75~6.49 ppm(f)位置的2个峰分别对应FA苯环上的H原子;8.11 ppm(d)和6.94 ppm(g)位置的2个峰分别对应FA上—NH—基团的H原子;4.33 ppm(b)、4.49 ppm(h)、8.65 ppm(i)位置的峰也与FA的<sup>1</sup>H-NMR相符;3.51 ppm和1.24 ppm位置的峰分别属于NH<sub>2</sub>-PEG2000-DSPE中—C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>、—OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—基团上的H原子。由此表明,载体材料FA-PEG2000-DSPE合成成功。

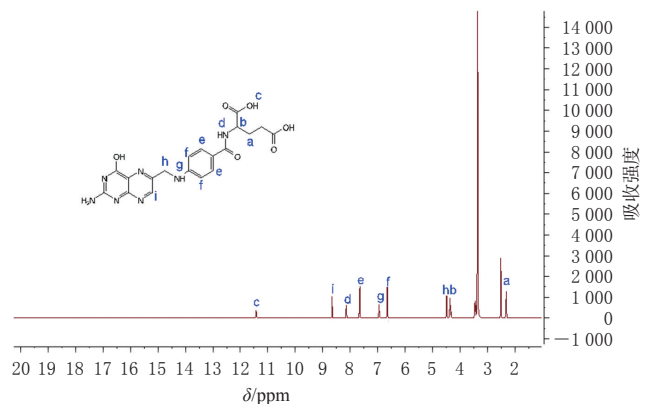


图2 FA的<sup>1</sup>H-NMR图

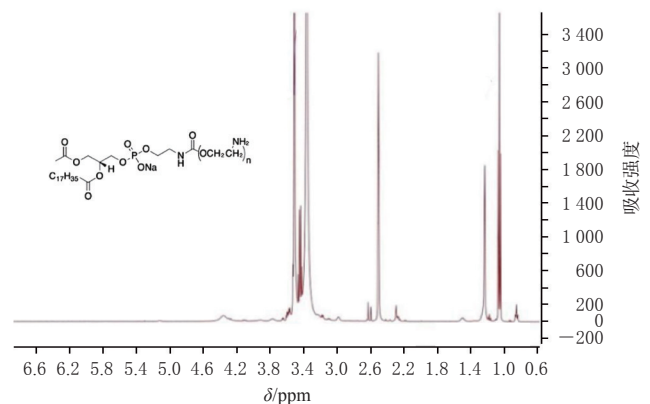


图3 NH<sub>2</sub>-PEG2000-DSPE的<sup>1</sup>H-NMR图

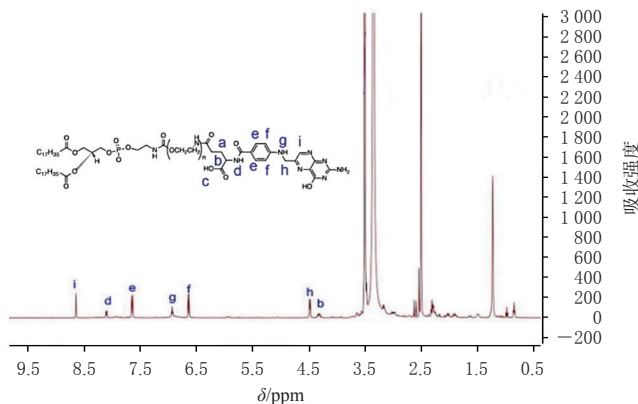


图4 FA-PEG2000-DSPE的<sup>1</sup>H-NMR图

### 3.2 FA修饰RBC的表征结果

傅里叶变换红外光谱仪检测结果(图5)显示, 1 601.1、1 451.4  $\text{cm}^{-1}$ 为FA-RBC中FA上苯环 $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ 的骨架振动峰; 3 294.8  $\text{cm}^{-1}$ 归属于FA上的羟基; 864.5  $\text{cm}^{-1}$ 为FA苯环对位二取代的振动峰; 1 156.1  $\text{cm}^{-1}$ 为N—H振动峰。由此可知,FA已被成功修饰至RBC上。

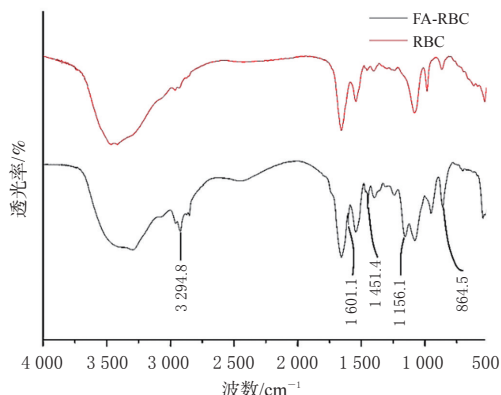


图5 RBC和FA-RBC的红外光谱图

### 3.3 DOX-CS-NPs的表征结果

DOX-CS-NPs的载药量为 $(15.09 \pm 1.36)\%$ ,包封率为 $(60.99 \pm 0.92)\%$ ,平均粒径为 $(152.500 \pm 2.554)$  nm, PDI为 $0.124 \pm 0.042$ , Zeta电位为 $(10.100 \pm 0.216)$  mV, 其中粒径分布和Zeta电位见图6。由此可知,DOX-CS-NPs的粒径较小、分布均匀。

### 3.4 FA-RBC-DOX-CS-NPs的表征结果

FA-RBC-DOX-CS-NPs的平均粒径为 $(254.200 \pm 2.651)$  nm, PDI为 $0.199 \pm 0.031$ , Zeta电位为 $(-10.100 \pm 0.213)$  mV, 具体见图7。由于RBC本身带负电, DOX-CS-NPs经FA-RBC包被后由带正电荷转变为带负电荷, 由此可知,FA-RBC-DOX-CS-NPs已被成功构建。

### 3.5 体外释放特性考察结果

由体外释放曲线(图8)可知,在2种释放条件下, DOX原药均释放最快, DOX-CS-NPs次之, FA-RBC-

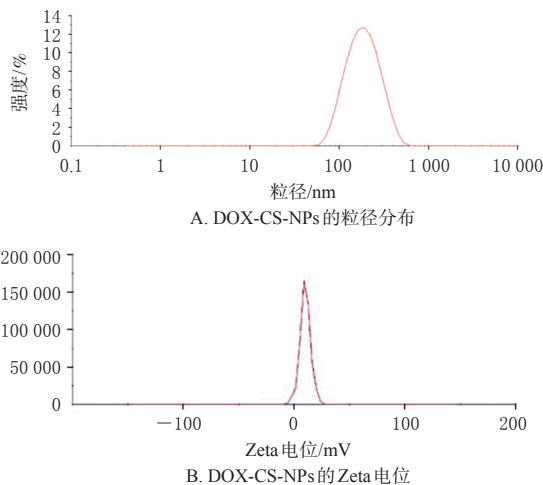


图6 DOX-CS-NPs的粒径分布和Zeta电位

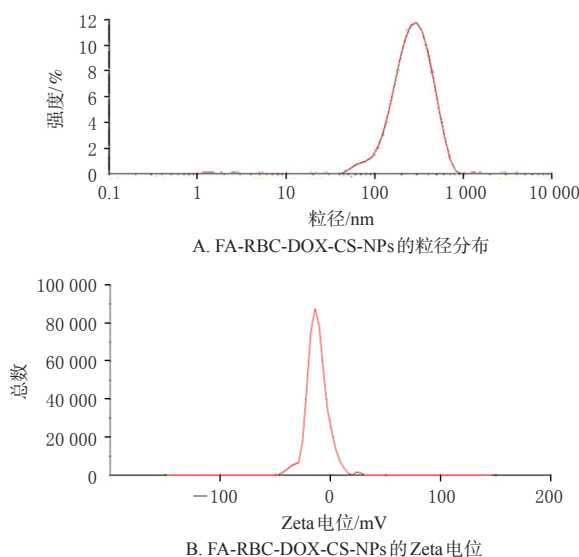


图7 FA-RBC-DOX-CS-NPs的粒径分布和Zeta电位

DOX-CS-NPs最慢。在pH7.4的释放介质中,DOX在8 h左右释放完全, DOX-CS-NPs在72 h左右释放完全, FA-RBC-DOX-CS-NPs在72 h的累积释放率约为90%。在pH6.5的释放介质中,这3种药物(制剂)的释放速率均比在pH7.4的释放介质中快,DOX在2 h左右释放完全, DOX-CS-NPs在12 h内释放完全, FA-RBC-DOX-CS-NPs在36 h内释放完全。由此可知,DOX-CS-NPs和FA-RBC-DOX-CS-NPs在模拟肿瘤微环境(pH6.5)中的释药速率均快于生理条件(pH7.4),这一特性可以减少药物在体循环中的释放,增加药物在肿瘤组织中的释放,从而减少副作用,增强药物抗肿瘤疗效。Evans等<sup>[15]</sup>研究发现,在生理条件(pH7.4)下,红细胞发生溶血的概率不大,而肿瘤微环境(pH6.5)中,红细胞会出现强烈溶血。笔者推测这可能是FA-RBC-DOX-CS-NPs在肿瘤微环境(pH6.5)中释放速率显著增加的原因之一。

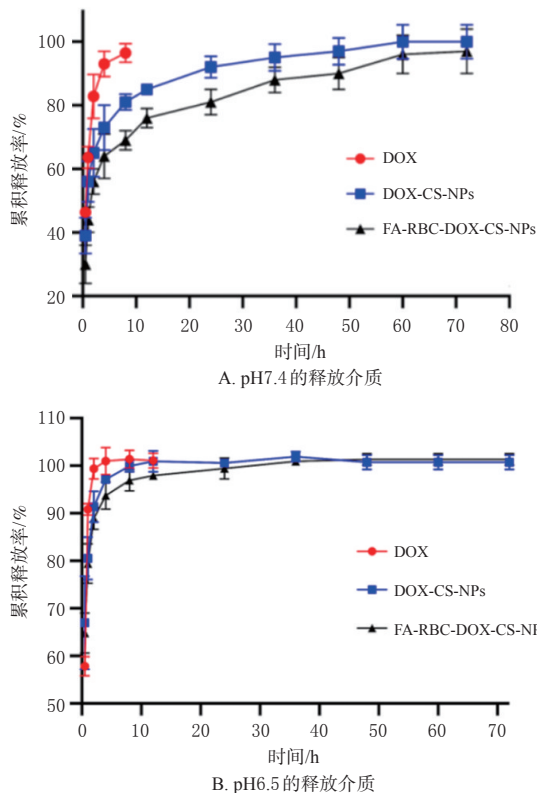


图8 DOX、DOX-CS-NPs、FA-RBC-DOX-CS-NPs在不同pH释放介质中的体外释放曲线

### 3.6 体外抗肿瘤活性考察结果

DOX、DOX-CS-NPs、FA-RBC-DOX-CS-NPs对MCF-7细胞增殖活力的影响见图9。由图9可知,当DOX质量浓度在0.500~5.000  $\mu\text{g/mL}$ 范围内,3种药物(制剂)对MCF-7细胞的抑制作用均呈浓度依赖趋势,MCF-7细胞的增殖能力随着DOX质量浓度的升高而减弱。当DOX

质量浓度在0.010~5.000  $\mu\text{g/mL}$ 范围内时,DOX-CS-NPs和FA-RBC-DOX-CS-NPs对MCF-7细胞的抑制效果不如DOX明显,这可能是由于上述2种纳米制剂将药物包裹在纳米粒内,使其释放速率减慢,短时间内无法直接作用于肿瘤细胞。

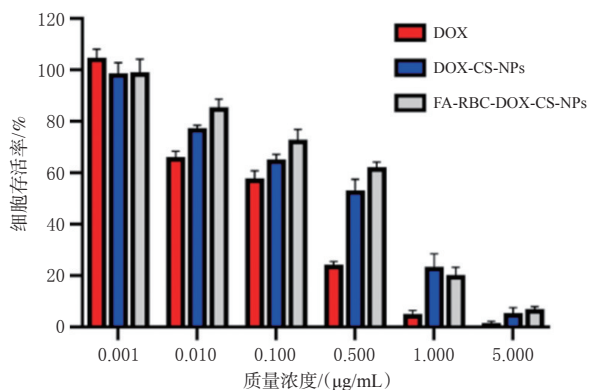


图9 DOX、DOX-CS-NPs、FA-RBC-DOX-CS-NPs对MCF-7细胞增殖活力的影响

### 3.7 细胞摄取实验结果

在体外抗肿瘤活性结果的基础上,为研究FA-RBC-DOX-CS-NPs对肿瘤细胞的靶向性和侵袭能力,考察了DOX质量浓度为5  $\mu\text{g/mL}$ 时,经DOX、FA-RBC-DOX-CS-NPs和FA+FA-RBC-DOX-CS-NPs处理1、4 h后DOX的入胞行为,结果见图10。由图10可知,处理1 h后,3种药物(制剂)均被细胞摄取,但在细胞内的浓度均较低,且差别不大。处理4 h后,细胞内3种药物(制剂)的荧光强度均增强,表明细胞对DOX的摄取随作用时间的增加而增加;其中FA-RBC-DOX-CS-NPs处理后的细胞的荧光强度最强,DOX次之,FA+FA-RBC-DOX-CS-

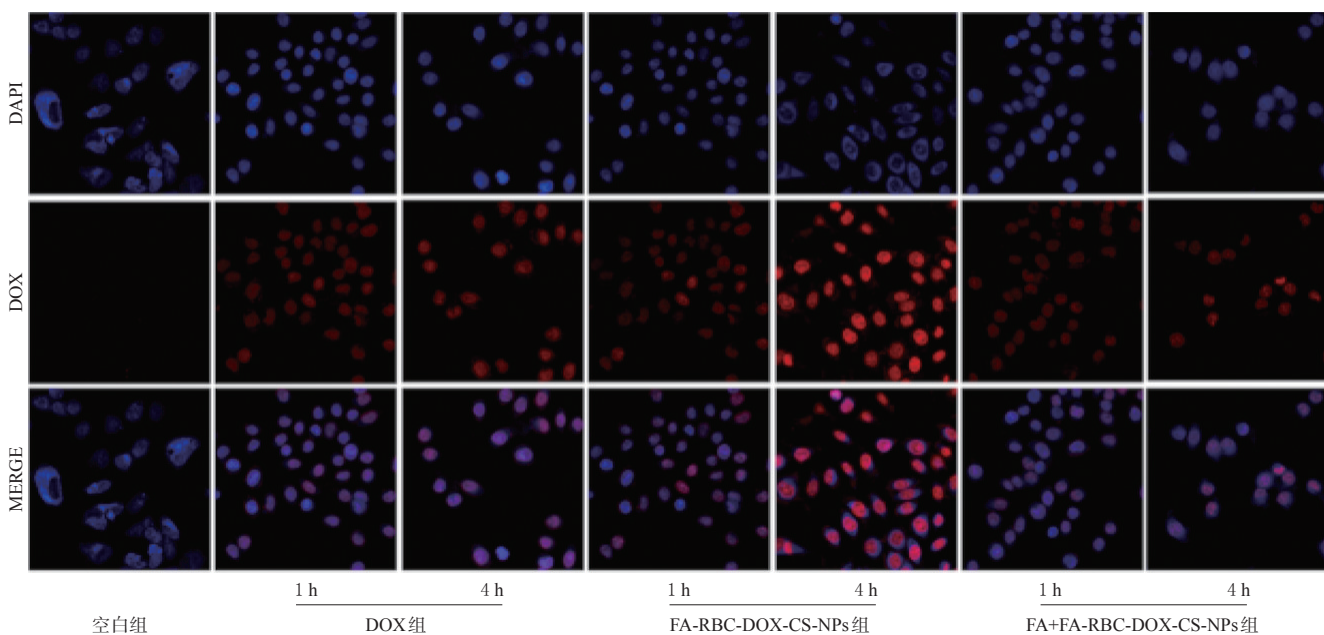


图10 MCF-7细胞对3种药物(制剂)的摄取结果( $\times 100$ )

NPs最弱。由此可知,FA-RBC-DOX-CS-NPs能主动识别肿瘤细胞表面的FA受体并特异性结合,从而提高DOX的入胞效率。FA+FA-RBC-DOX-CS-NPs处理细胞后,细胞表面受体被游离FA封闭,无法靶向识别纳米粒,从而降低了DOX的入胞效率。

#### 4 结语

本研究以DOX为模型药物,用壳聚糖和三聚磷酸钠采用离子交联法制备了DOX-CS-NPs,再用经FA-PEG2000-DSPE修饰后的RBC,构建得到FA-RBC-DOX-CS-NPs。该纳米粒的平均粒径为 $(254.200 \pm 2.651)$  nm,PDI为 $0.199 \pm 0.031$ ,Zeta电位为 $(-10.100 \pm 0.213)$  mV。细胞实验结果也表明,该纳米粒对肿瘤细胞表面高表达的FA受体有明确的靶向性,能有效提高药物的入胞效率,实现肿瘤细胞内药物富集。

#### 参考文献

[1] ZHAO Y, ZHOU Y, WANG D, et al. pH-responsive polymeric micelles based on poly(2-ethyl-2-oxazoline)-poly(D, L-lactide) for tumor-targeting and controlled delivery of doxorubicin and P-glycoprotein inhibitor[J]. *Acta Biomater*, 2015, 17: 182-192.

[2] 周超培,刘芊芊,杨春荣,等.红细胞载药递送系统的研究进展[J].*中国药房*, 2020, 31(2): 238-245.

[3] 陈刚,陈庆华.红细胞作为药物载体的研究进展[J].*中国医药工业杂志*, 1994, 25(8): 376-381.

[4] HAN X, WANG C, LIU Z. Red blood cells as smart delivery systems[J]. *Bioconjug Chem*, 2018, 29(4): 852-860.

[5] VILLA C H, ANSELMO A C, MITRAGOTRI S, et al. Red blood cells: supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 106(Pt A): 88-103.

[6] GAO W W, ZHANG L F. Engineering red-blood-cell-membrane-coated nanoparticles for broad biomedical applications[J]. *AIChE J*, 2015, 61(3): 738-746.

[7] FANG R H, HU C M, CHEN K N, et al. Lipid-insertion enables targeting functionalization of erythrocyte mem-

brane-cloaked nanoparticles[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(19): 8884-8888.

[8] GAO W W, ZHANG L F. Coating nanoparticles with cell membranes for targeted drug delivery[J]. *J Drug Target*, 2015, 23(7/8): 619-626.

[9] ANTONELLI A, MAGNANI M. Red blood cells as carriers of iron oxide-based contrast agents for diagnostic applications[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(9): 1732-1750.

[10] XIAO F, FAN J L, TONG C Y, et al. An erythrocyte membrane coated mimetic nano-platform for chemo-phototherapy and multimodal imaging[J]. *RSC Adv*, 2019, 9(48): 27911-27926.

[11] HOLM J, HANSEN S I. Characterization of soluble folate receptors (folate binding proteins) in humans. Biological roles and clinical potentials in infection and malignancy[J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2020, 1868(10): 140466.

[12] CHEN J, DOU Y S, TANG Y, et al. Folate receptor-targeted RNAi nanoparticles for silencing STAT3 in tumor-associated macrophages and tumor cells[J]. *Nanomedicine*, 2020, 25: 102173.

[13] SOUTO G D, FARHANE Z, CASEY A, et al. Evaluation of cytotoxicity profile and intracellular localisation of doxorubicin-loaded chitosan nanoparticles[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(20): 5443-5455.

[14] 祝侠丽,王莎莎,李玲华,等.基于近红外光响应性的盐酸阿霉素纳米脂质体的制备工艺优化[J].*中国药房*, 2019, 30(10): 1312-1315.

[15] EVANS B C, NELSON C E, YU S S, et al. *Ex vivo* red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs[J]. *J Vis Exp*, 2013(73): e50166.

(收稿日期:2022-01-07 修回日期:2022-05-27)

(编辑:唐晓莲)

(上接第1593页)

[15] 田晴晴,罗乐,张夏丽,等.白杨素对大鼠主动脉舒张作用的影响[J].*中国病理生理杂志*, 2016, 32(4): 618-622.

[16] 乔海琦,闫琳,余洋,等.氧化槐果碱对离体大鼠胸主动脉环的舒张作用及其机制研究[J].*中国药房*, 2019, 30(22): 3057-3061.

[17] ARRUDA-BARBOSA L, RODRIGUES K M, SOUZA-NETO F D, et al. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethene in rat isolated aortic rings[J]. *Vascul Pharmacol*,

2014, 63(2): 55-62.

[18] PUTNEY J W, STEINCKWICH-BESANÇON N, NUMAGATOMITA T, et al. The functions of store-operated calcium channels[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, 1864(6): 900-906.

(收稿日期:2022-03-09 修回日期:2022-05-23)

(编辑:林静)