

载血卟啉单甲醚电荷反转型纳米载体构建及评价

徐爱仁¹, 戎建辉¹, 陈梦嘉¹, 冯政红¹, 马卫成^{1*}, 沈松³, 金一²

(1. 宁波市泌尿肾病医院, 浙江 宁波 315100; 2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004;
3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 构建具有电荷反转功能的纳米载体, 实现药物的溶酶体逃逸, 提高抗肿瘤效果。合成胆固醇-聚乙烯亚胺-六氢邻苯二甲酸酐 (Chol-PEI-HHPA) 聚合物, 利用 ¹H NMR 进行结构表征, 构建具有电荷反转功能的脂质体 (Lipo-HHPA) 并负载声敏药物血卟啉单甲醚 (HMME), 考察 Lipo-HHPA-HMME 在不同 pH 条件下的电荷反转情况, 利用 MCF-7 细胞研究载体的溶酶体逃逸及细胞毒性。结果显示, 所构建的 Lipo-HHPA 外观均匀, 平均粒径为 102 nm, 在超声激发下可实现 HMME 的突释; 当 pH 从 7.4 变为 4.5 时, 其表面电位由 -23.5 mV 反转为 +21.2 mV; 体外细胞实验结果显示, Lipo-HHPA 可逃逸溶酶体降解, 提高 HMME 的细胞毒性。以上结果表明, 电荷反转型载体有利于增强药物的细胞毒性, 提高抗肿瘤效果。

关键词: 电荷反转; 溶酶体逃逸; 血卟啉单甲醚; 声动力治疗; 靶向递送

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 10-1605-06

Construction and evaluation of charge-reversal nanocarrier loaded with hematoporphyrin monomethyl ether

XU Ai-ren¹, RONG Jian-hui¹, CHEN Meng-jia¹, FENG Zheng-hong¹, MA Wei-cheng^{1*},
SHEN Song³, JIN Yi²

(1. Ningbo Urinary and Renal Diseases Hospital, Ningbo 315100, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Charge-reversal nanocarrier was constructed to enhance lysosomal escape and improve antitumor effect. We synthesized the cholesterol-polyethyleneimine-hexahydrophthalic anhydride (Chol-PEI-HHPA) polymer and characterized by ¹H NMR. The charge-reversal liposomes (Lipo-HHPA) were synthesized and the hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) was loaded. pH-triggered charge conversion was determined at different pH values. The lysosomal escape and cytotoxicity of the Lipo-HHPA were evaluated in MCF-7 cells. The Lipo-HHPA was uniform with an average particle size of 102 nm. Upon the irradiation of ultrasound, burst release of HMME could be observed. The zeta potential of Lipo-HHPA changed sharply from negative (-23.5 mV) to positive (+21.2 mV) over the pH range of 7.4–4.5. In the cellular uptake experiment, the lysosomal escape of Lipo-HHPA was observed. HMME loaded Lipo-HHPA displayed obviously enhanced cytotoxicity towards MCF-7 cells. These results indicate that the charge-reversal liposomes hold a great potential in improving the cytotoxicity and antitumor effect.

Key words: charge conversion; lysosomal escape; hematoporphyrin monomethyl ether; sonodynamic therapy; targeted delivery

收稿日期: 2017-05-02; 修回日期: 2017-06-13.

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY14H300001); 国家博士后基金项目 (2015M580404, 2016T90433); 江苏省博士后基金项目 (1402075B).

*通讯作者 Tel: 86-574-83038595, E-mail: weichengma@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0431

在药物靶向传递过程中, 要克服多重障碍, 包括经过血液循环到达肿瘤部位、进入肿瘤细胞, 细胞内溶酶体降解等。其中逃逸溶酶体降解是提高药物靶向传递效率的又一途径。阳离子聚合物 (polycation) 如壳聚糖 (chitosan)、聚赖氨酸 (PLL) 和聚乙烯亚胺 (PEI) 等, 在细胞内具有“质子海绵效应”, 可通过吸收大量水分导致溶酶体破裂, 最终协助药物逃逸降解, 进而实现高效递送^[1]。利用该原理已经实现 DNA^[2]和 siRNA^[3]等多种物质的递送, 但在传递过程中, 阳离子聚合物会与带负电的血浆蛋白结合导致严重的凝血反应^[4, 5], 同时还容易被巨噬细胞系统 (RES) 识别并清除。因此, 如何解决这一矛盾成为提高靶向效率的关键。具有电荷反转功能的聚合物的出现, 为解决这一矛盾提供了可能。利用带负电化合物对阳离子聚合物进行可逆修饰, 使其在血液中带负电荷, 当到达肿瘤组织或癌细胞内后通过水解等方法脱去负电化合物, 再生为阳离子聚合物, 即可实现电荷反转^[6, 7]。Xu 等^[8]研究显示酰胺键的水解具有 pH 依赖性, 其在 pH 5 时水解较快; pH 6 时较慢; pH 7.4 环境下 60 h 仅水解 50%。本文构建胆固醇-聚乙烯亚胺-六氢邻苯二甲酸酐 (Chol-PEI-HHPA) 修饰的脂质体, 当其进入溶酶体 (pH 4.5~5.5) 时 PEI 与 HHPA 之间的酰胺键水解断裂, 促使 PEI 再生, 从而协助药物逃逸溶酶体, 提高靶向效率。

材料与方法

药品与试剂 血卟啉单甲醚 (HMME, 上海笛柏化学品有限公司); 六氢邻苯二甲酸酐 (HHPA, 国药化学试剂有限公司); 聚乙烯亚胺 (PEI, M_w 800)、

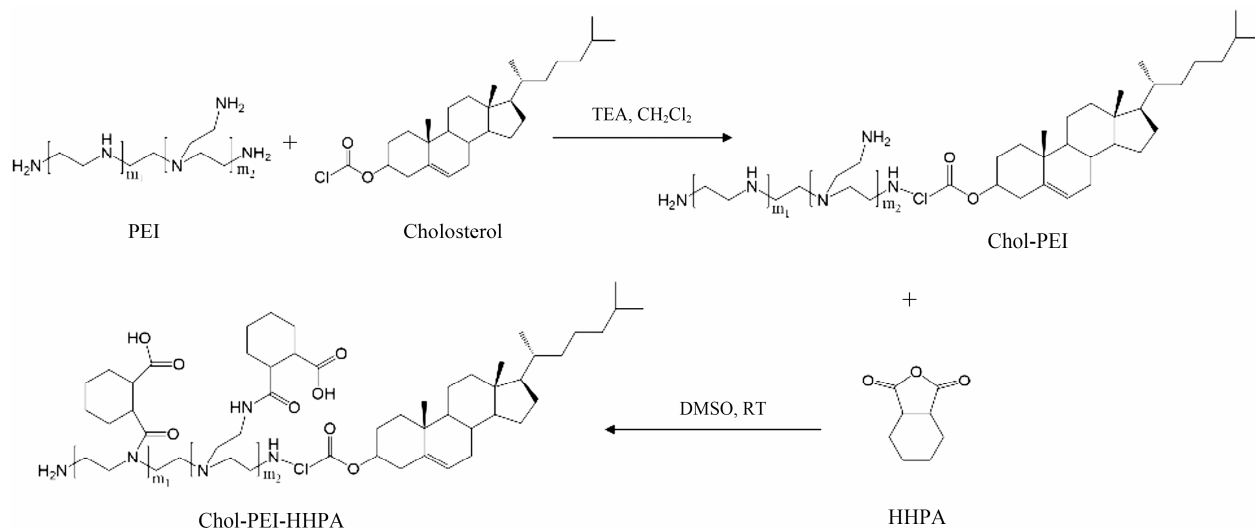
酰氯胆固醇 (阿拉丁试剂有限公司); 噻唑蓝 (MTT, Sigma 试剂公司); 人乳腺癌 MCF-7 细胞 (中国科学院上海生化与细胞研究所); 其他试剂均为分析纯。

仪器 超声治疗仪 (838A, 深圳圣祥科技有限公司); 透射电子显微镜 (TEM, JEM-2100, 日本电子株式会社); 酶标仪 (Thermo MK3, 美国热电公司); 纳米粒径仪 (ZS90, 英国马尔文公司); 激光共聚焦显微镜 (TCS SP5 II, 德国莱卡公司); 核磁共振光谱仪 (Avance II 400MHz, 瑞士布鲁克公司); 紫外可见分光光度仪 (UV-2450, 日本岛津公司)。

Chol-PEI-HHPA 的合成 按照已有文献^[9, 10]并经修改后合成 Chol-PEI。具体步骤如下: 取聚乙烯亚胺 (PEI, 800 Da) 2 g 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加二氯甲烷 20 mL 和三乙胺 0.2 mL, 冰浴中搅拌反应 30 min。称取酰氯胆固醇 2 g, 溶于 10 mL 冰二氯甲烷, 然后将其于 30 min 内缓缓滴加至上述 PEI 溶液中, 冰浴搅拌反应 12 h。反应完成后旋转蒸发除去有机溶剂, 真空干燥后加入 0.1 mol·L⁻¹ HCl 100 mL 溶解, 利用二氯甲烷萃取数次, 除去未反应的酰氯胆固醇, 水溶液冻干后, 得 Chol-PEI 产物。

取 Chol-PEI 0.2 g 与 HHPA 0.6 g 共溶于适量二甲亚砜 (DMSO) 中, 在室温氮气保护下搅拌反应 48 h, 反应完成后加入无水乙醚沉淀纯化数次, 将沉淀真空干燥即得 Chol-PEI-HHPA, -20 °C 保存备用 (合成路线图 1)。所得产物用氘代氯仿溶解后装入核磁管中, 室温下用核磁共振仪测定, 用 NUTS 软件积分处理数据。

电荷翻转脂质体 (Lipo-TPP) 的制备及 HMME 的负载 载 HMME 脂质体的制备分两步, 首先制备



Scheme 1 A schematic diagram showing the synthesis of cholesterol-polyethyleneimine-hexahydrophthalic anhydride (Chol-PEI-HHPA)

空白脂质体, 再通过孵育进行载药。这主要是由于在脂质体制备过程中需要进行超声分散, 而 HMME 在超声过程中会产生活性氧, 进而氧化脂质导致脂质体破坏。按照重量比 4:1:0.1 精密称取大豆磷脂、胆固醇 (Chol)、Chol-PEI-HHPA 溶于适量氯仿中, 加入磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.6) 后, 利用细胞超声破碎仪超声 5 min, 形成乳浊液, 然后减压除去有机溶剂, 微孔滤膜 (0.22 μm) 过滤后, 得到电荷反转脂质体 (Lipo-HHPA)。用 Chol 代替 Chol-PEI-HHPA, 利用相同方法制备普通脂质体。取少量脂质体滴于 200 目铜网, 经 1% 磷钨酸染色后, 利用 TEM 进行观察。样品经过稀释后, 利用激光粒径仪测定 Lipo-HHPA 的粒径分布。

将所制备的电荷反转脂质体与 HMME 甲醇溶液 (300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 按照体积 1:1 混合后, 搅拌 2 h 后超速离心 (40 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 30 min 分离脂质体, 水洗 3 次后, 得载药脂质体, 标记为 Lipo-HHPA-HMME。收集上清后, 通过紫外测定 HMME 浓度, 计算载药量。载药普通脂质体 (Lipo-HMME) 的制备方法与 Lipo-HHPA 相同。

体外释放研究 取所得 Lipo-HHPA-HMME (含 HMME 50 μg) 1 mL, 经超声处理 3 min 或不经超声处理后, 装入透析袋 (MWCO 10 kDa) 中, 置于 50 mL PBS (pH 7.4) 中, 继续搅拌 2 h (50 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 分别在 15、30 min, 1、2 h, 取出样品 1 mL, 同时补充空白 PBS 1 mL, 所取样品在 396 nm 处测定吸光度, 计算 HMME 浓度及累计释放百分率。

Zeta 电位反转研究 为了研究 HHPA 脱落对 Lipo-HHPA 表面电位的影响, 将 Lipo-HHPA 与不同 pH 缓冲盐溶液共孵育后, 测定其 zeta 电位。取 1 mL Lipo-HHPA 与 2 mL 不同 pH (7.4、6.5、5.5、4.5) 的 PBS 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h, 完成后取 300 μL 溶液加入到 2 mL 相同 pH 的 PBS 中, 然后利用粒径电位仪测定 zeta 电位。

细胞培养 人乳腺癌 (MCF-7) 细胞用于载体的细胞评价研究, 培养基为含 10% 胎牛血清和青霉素/链霉素双抗的 RPMI 1640, 培养温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, 培养环境为 5% CO_2 气体。

Lipo-HHPA 的溶酶体逃逸研究 本研究的主要目的为构建具有溶酶体逃逸功能的载体, 从而提高其药物的递送效率。为此, 利用 LysoTracker 对溶酶体进行标记, 通过激光共聚焦显微镜研究 Lipo-HHPA 的细胞内定位情况。首先, 将 MCF-7 细胞按照每孔

1×10^5 细胞数接种于单孔细胞培养板中, 培养 24 h 后, 加入 Lipo-HHPA-HMME 及 Lipo-HMME (HMME 质量浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 孵育 4 h 后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 LysoTracker Green 30 min 后, 再洗涤 3 次, 经 Hoechst 染色后加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 利用荧光显微镜观察细胞并记录。

空白载体毒性评价 采用 MTT 法测定空白脂质体的细胞毒性, 具体方法如下: 将对数生长期 MCF-7 细胞接种于 96 孔细胞培养板 (每孔 5×10^3 细胞数), 待细胞完全贴壁后, 每孔分别加入不同浓度的 Lipo-HHPA 空白脂质体, 使得脂质体的终质量浓度为 5、10、20、50、100、200、500 和 1 000 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 继续培养 24 h 后, 将培养液换成新鲜培养基, 并加入 MTT 溶液 (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 31.5 μL , 4 h 后吸出培养液, 加入二甲亚砜溶液 200 μL , 10 min 后利用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度, 计算存活百分率。

Lipo-HHPA-HMME 的体外抗肿瘤效果评价 将 MCF-7 按照空白脂质体毒性评价方法接种于 96 孔板后, 分别加入不同浓度的游离 HMME、Lipo-HHPA-HMME 或 Lipo-HMME 培养 4 h 后, 分别用超声仪在 1.0 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 功率强度下超声 3 min, 继续培养 24 h, 以未经超声的细胞作为对照, 按照上述 MTT 方法测定细胞存活率。

结果与讨论

1 Chol-PEI-HHPA 的合成及表征

通过 ^1H NMR 对化合物中氢核的化学位移进行检测, 确定 Chol-PEI-HHPA 的生成。图 1 为 Chol-PEI-HHPA 的 ^1H NMR 图谱, 具体参数如下: 0.693 (CH_3 , cholesterol)、0.904 [$(\text{CH}_3)_2$, cholesterol]、0.919 (CH_3 , cholesterol)、1.072 (CH_3 , cholesterol)、1.216~2.021 (CH_2CH_2 和 CHCH_2 , cholesterol)、4.457 ($=\text{CH}=\text{CHC}$, cholesterol)、5.357 ($=\text{CH}-\text{C}$, cholesterol)、2.5~3.4 (PEI) 和 1.92, 1.85, 1.53, 1.51 (HHPA)。以上结果证明 Chol-PEI-HHPA 成功合成。

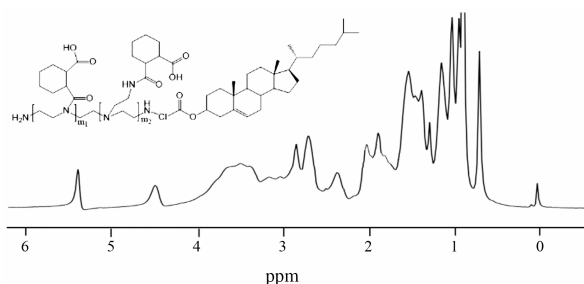


Figure 1 The ^1H NMR spectrum of Chol-PEI-HHPA

2 Lipo-HHPA 的表征及载药量测定

通过 TEM 对制备的 Lipo-HHPA 进行表征, 结果见图 2。从图 2A 中可以看出, 所制备的 Lipo-HHPA 外观为类球形, 分散均匀, 粒径均一, 平均粒径约为 90 nm, 所得脂质体均为单室脂质体, 未见多层结构。同时通过激光粒径仪测定脂质体的水合粒径, 记录平均粒径及多分散系数, 从粒径分布图 (图 2B) 可以看出, 所制备的脂质体粒径成正态分布, 平均粒径为 102 nm, 多分散性系数为 0.261。体外载药结果显示, HMME 的载药量为 1.37%。

3 Lipo-HHPA-HMME 的体外释放考察

由于脂质体的主要成分为磷脂, 对氧化较为敏感, 被氧化后易导致脂质体结构的破坏及药物的释放, 而 HMME 作为一种光敏剂, 同时也是声敏剂, 可在超声的激发下产生活性氧, 氧化破坏脂质体。因此, 考察 Lipo-HHPA-HMME 在超声及非超声条件下的释放情况, 结果见图 3。在无超声激发的条件下, 药物释放缓慢, 0.5 h 释放 14.3%, 2 h 释放 26.3%, 这可能与 HMME 为脂溶性药物、磷脂亲和性较强以及在水中溶解度较小有关。经过 $1.0 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 超声处理 3 min 后, 药物释放速率显著提高, 0.5 h 释放 59.1%, 2 h 释放 70.3%。该结果表明, 超声可以激发 HMME 产生 ROS, 氧化破坏脂质体, 显著提高药物的释放速率, 而这种触发释放对载体的体内特异性治疗具有重要意义。

4 Lipo-HHPA 的电荷反转研究

本文的主要目的为构建具有电荷反转功能的载体, 以实现载体在酸性条件下从负电到正电的转变, 载体在不同 pH 条件下的表面 zeta 电位变化情况见图 4。从图中可以看出, 在正常生理 pH 条件下, 载体带有负电荷, 表面电位为 -23.5 mV 。随着 pH 的降低, Lipo-HHPA 的表面电位逐渐升高, 当 pH 达到 4.5 时, 表面电位达到 $+21.2 \text{ mV}$ 。该结果是由于 PEI 与 HHPA 所形成的酰胺键在酸性条件下快速水解, 从而导致

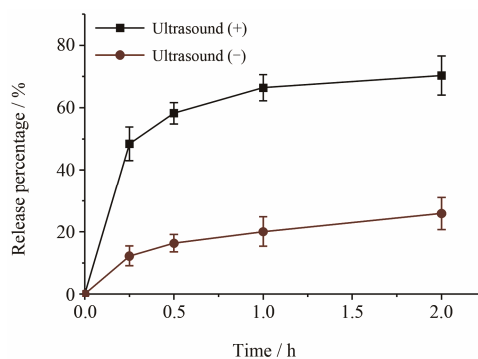


Figure 3 The release of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) from Lipo-HHPA with or without the irradiation of ultrasound

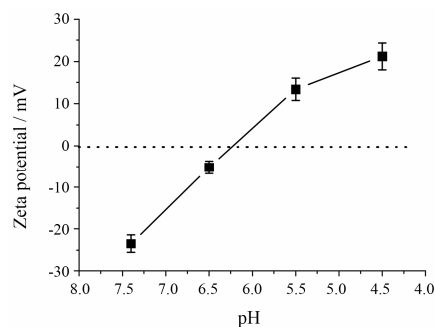


Figure 4 Zeta potential of Lipo-HHPA at different pH values

HHPA 脱落, 使 Lipo-HHPA 表面所修饰的 Chol-PEI-HHPA 转变为 Chol-PEI, 由于 PEI 的强正电作用, 导致表面电位升高。

5 Lipo-HHPA 在细胞溶酶体的逃逸研究

为了进一步证实 HHPA 的脱落及其脱落对药物摄取的影响, 考察了 Lipo-HMME 与 Lipo-HHPA-HMME 经细胞摄取后的胞内分布情况, 结果见图 5。从图 5A 中可以看出, 普通 Lipo 经过细胞摄取 4 h 后, HMME 的荧光与溶酶体荧光基本重合, 表明普通 Lipo 经细胞摄取后主要存在于溶酶体中, 4 h 后并未逃逸溶酶体。从 Lipo-HHPA 的摄取图 (图 5B) 中可以看出, HMME 荧光出现在溶酶体以外区域, 这表明 Lipo-HHPA 在细胞摄取 4 h 后可从溶酶体中部分逃逸, 提示 Lipo-HHPA

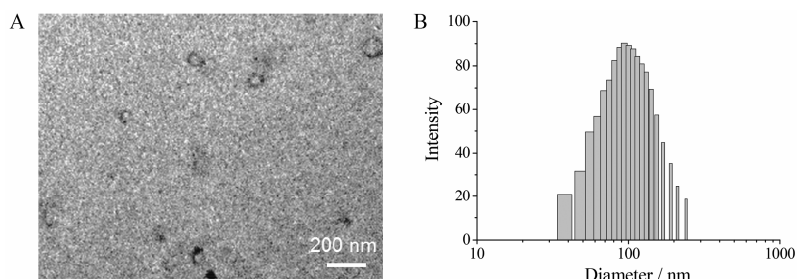


Figure 2 Transmission electron microscope (TEM) image (A) and particle size distribution (B) of HHPA modified liposomes (Lipo-HHPA)

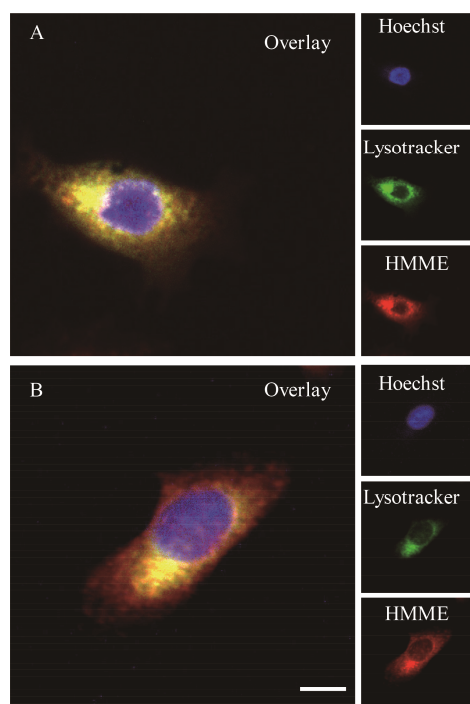


Figure 5 Fluorescent images of MCF-7 cells after incubation with HMME loaded liposomes (Lipo-HMME) (A) and HMME loaded HHPA modified liposomes (Lipo-HHPA-HMME) (B) for 4 h. The lysosomes were stained by LysoTracker Green, green-lysosomes; red-HMME. Scale bar = 10 μm

具有更好的抗肿瘤效果。同时考察 Lipo-HHPA-HMME 的细胞经时摄取情况, 结果见图 6。从图中可以看出, 随着摄取时间的延长, 药物的摄取量显著增加, 说明 Lipo-HHPA-HMME 的摄取具有时间依赖性。

6 Lipo-HHPA-HMME 的体外细胞毒性研究

在药物靶向传递过程中, 所使用的载体本身应无毒、具有良好的生物相容性。因此, 首先考察空白 Lipo-HHPA 的体外细胞毒性 (图 7), 将不同浓度的 Lipo-HHPA 与 MCF-7 细胞孵育 24 h 后, 并未对细胞存活率产生显著影响, 当质量浓度高达 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 细胞存活率仍超过 90%, 这表明空白载体本身的细胞毒性很小。

Lipo-HHPA-HMME 在超声和非超声条件下的细胞毒性结果见图 8。从图中可以看出, 在无超声激发条件下 (图 8A), 游离 HMME、Lipo-HHPA-HMME 及 Lipo-HMME 均具有一定的细胞毒性, 这可能是由于 HMME 作为光敏剂, 在实验过程中难以做到完全闭光, 因此具有一定的毒性。相对于 Lipo-HMME, 游离 HMME 具有更强的细胞毒性, 这可能是由于游离药物更易进入细胞直接发挥作用, 被 Lipo 包裹的 HMME 毒性有所降低, 这可能也是临床应用中脂质体药物毒性降低的原因。Lipo-HHPA-HMME 组相对

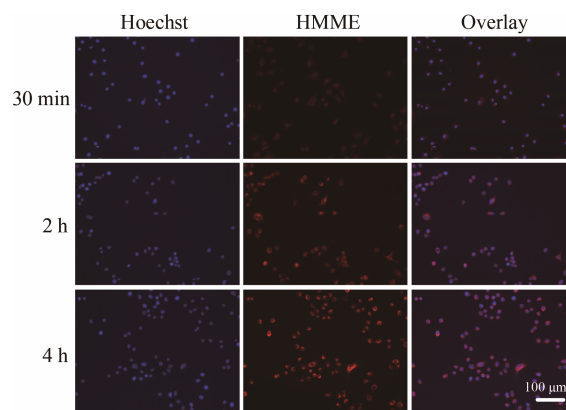


Figure 6 Fluorescence microscopic images of MCF-7 cells after incubation with stained with Lipo-HHPA-HMME for 30 min, 2 h and 4 h

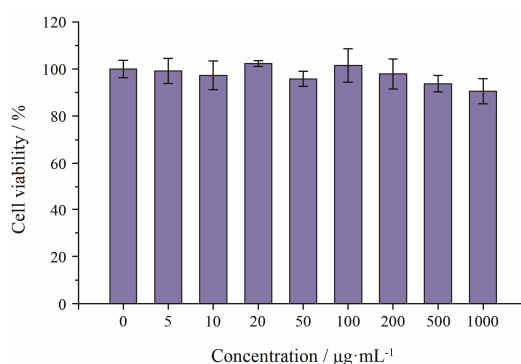


Figure 7 The cytotoxicity of blank Lipo-HHPA

于其他组具有更强的细胞毒性, 这可能是由于 Lipo-HHPA 协助 HMME 逃逸溶酶体降解, 从而发挥更强的细胞毒性。

超声触发后, 3 组药物的细胞毒性均显著增强 (图 8B), 说明超声可激发 HMME 产生 ROS 导致更强细胞毒性, 游离 HMME 相对于其他组毒性最低, 这是由于脂质体在 ROS 条件下迅速破坏, 导致 HMME 快速释放, 该结果与体外释放结果一致。Lipo-HHPA-HMME 组显示出最强细胞毒性, 表明逃逸溶酶体降解可提高药物的抗肿瘤效果。从细胞形态图 (图 8C) 可以看出, 未经处理的细胞伸展良好, 形态规则, 单纯超声对细胞形态并无显著影响, Lipo-HMME 组与 Lipo-HHPA-HMME 组均可导致细胞发生明显变化, Lipo-HHPA-HMME 组毒性最大, 处理后的细胞明显变圆, 失去原形貌。以上结果表明, Lipo-HHPA 有助于协助 HMME 逃逸溶酶体降解, 可显著提高药物的细胞毒性。由于脂质体可通过高通透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention, EPR) 进入肿瘤部位, 常作为抗肿瘤药物载体^[11], 因此所构建的电荷反转型脂质体有利于提高药物的抗肿瘤效果, 降低药物毒性。

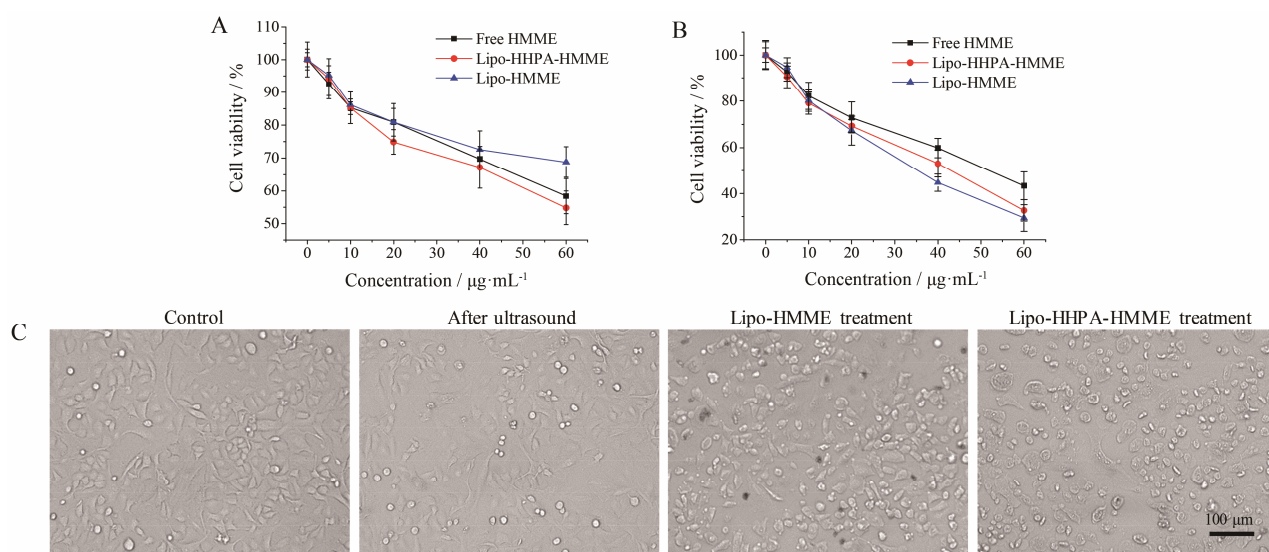


Figure 8 Antiproliferation of free HMME, Lipo-HMME and Lipo-HHPA-HMME without (A) and with (B) irradiation of ultrasound. C: The morphology of MCF-7 cells after different treatments

结论

本文合成了 Chol-PEI-HHPA, 并利用其构建了具有电荷反转功能的脂质体用于负载声敏剂 HMME。所制备的脂质体外观均一, 成类球形, 平均粒径约为 100 nm。体外释放结果显示, 超声可显著提高药物的释放速率, 2 h 释放从 26.3% 提高到 70.3%。所构建的 Lipo-HHPA 在低 pH 条件下可实现电荷反转, 同时可促进药物逃逸溶酶体的降解, 提高药物的细胞毒性, 超声的激发可进一步提高载体的抗肿瘤效果。以上研究结果为新型抗肿瘤药物载体的构建提供一定的研究数据, 同时也为敏感释放药物载体的构建及肿瘤特异性治疗提供了新的思路。

References

- [1] Zhang L, Wang Y, Gao H, et al. The construction of cell-penetrating peptide R8 and pH sensitive cleavable polyethylene glycols co-modified liposomes [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 760–766.
- [2] Qin L, Cao D, Pan S, et al. Construction of serum-resistant cationic polymer α -CD-PAMAM and evaluation of its performances as gene delivery vector [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 139–145.
- [3] Wang Z, Bai F, Zhang X, et al. GGI as a gene carrier delivering MDR1 siRNA to A549/DDP cells for reversal of multidrug resistance [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 309–317.
- [4] Masago K, Itaka K, Nishiyama N, et al. Gene delivery with biocompatible cationic polymer: pharmacogenomic analysis on cell bioactivity [J]. Biomaterials, 2007, 28: 5169–5175.
- [5] Mo R, Sun Q, Xue J, et al. Multistage pH-responsive liposomes for mitochondrial-targeted anticancer drug delivery [J]. Adv Mater, 2012, 24: 3659–3665.
- [6] Wang C, Bao X, Ding X, et al. A multifunctional self-dissociative polyethyleneimine derivative coating polymer for enhancing the gene transfection efficiency of DNA/polyethyleneimine polyplexes *in vitro* and *in vivo* [J]. Polym Chem, 2015, 6: 780–796.
- [7] Guo Q, Guan D, Dong B, et al. Charge-conversional binary drug delivery polymeric micelles for combined chemotherapy of cervical cancer [J]. Int J Polym Mater Polym Biomater, 2015, 64: 978–987.
- [8] Xu P, Van Kirk EA, Zhan Y, et al. Targeted charge-reversal nanoparticles for nuclear drug delivery [J]. Angew Chem Int Ed, 2007, 46: 4999–5002.
- [9] Wang D, Narang AS, Kotb M, et al. Novel branched poly(ethylenimine)-cholesterol water-soluble lipopolymers for gene delivery [J]. Biomacromolecules, 2002, 3: 1197–1207.
- [10] Jiang Y, Mo H, Chen J. Gene transfer system mediated by PEI-cholesterol lipopolymer with lipid microbubbles [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 659–666.
- [11] Meng Q, Zhang P, Yin Q, et al. Photo-sensitive liposomes loading doxorubicin hydrochloride reverse drug resistance of breast cancer [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 809–820.