

· 药剂与炮制 ·

马钱子碱固体脂质纳米粒的细胞毒性及细胞摄取试验

管庆霞, 王利萍, 刘振强, 冯宇飞, 温美欣, 赵义军, 封文静, 吕邵娃*
(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:研究马钱子碱固体脂质纳米粒(brucine-loaded solid lipid nanoparticles, B-SLN)对 HepG2 的细胞毒性和细胞摄取情况。方法:采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测 B-SLN 对 HepG2 细胞的毒性,利用荧光显微镜定性观察细胞摄取情况,运用流式细胞仪定量检测不同条件下的细胞摄取情况。结果:马钱子碱组和 B-SLN 组对 HepG2 细胞增殖具有抑制作用,且抑制率随时间延长和药物质量浓度增加而上升。马钱子碱组 48,72 h 的半抑制浓度(IC_{50})分别为 208.5, 78.5 $mg \cdot L^{-1}$, B-SLN 组 48,72 h 的 IC_{50} 分别为 563.3, 114.9 $mg \cdot L^{-1}$;药物质量浓度在 125 ~ 500 $mg \cdot L^{-1}$ 时,随药物质量浓度的增加,细胞摄取量由 50.2% 增加到 71.2%;温度在 4 $^{\circ}C$ 和 37 $^{\circ}C$ 条件下,细胞摄取量由 43% 增加到 55.2%;摄取时间在 30 ~ 240 min 时,随孵育时间的增加,细胞摄取量由 9.7% 增加到 56.4%。结论:SLN 给药系统能显著提高马钱子碱对抗癌细胞的活性,且 B-SLN 具有增加药物被细胞摄取的能力。

[关键词] 马钱子碱; 固体脂质纳米粒; HepG2 细胞; 细胞毒性; 细胞摄取; 半抑制浓度

[中图分类号] R283.6; R945; R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0001-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1103.002.html>

[网络出版时间] 2016-12-07 11:03

Cytotoxicity and Cellular Uptake Test of Brucine-loaded Solid Lipid Nanoparticles

GUAN Qing-xia, WANG Li-ping, LIU Zhen-qiang, FENG Yu-fei, WEN Mei-xin, ZHAO Yi-jun,
FENG Wen-jing, LYU Shao-wa*
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate cytotoxicity and cellular uptake of brucine-loaded solid lipid nanoparticles (B-SLN) on HepG2 cells. **Method:** 3-(4, 5-Dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) assay was used to detect the cytotoxicity of B-SLN on HepG2 cells, the cellular uptake experiments were observed by fluorescence microscopy, flow cytometry was used to detect the cellular uptake of cells under different conditions. **Result:** Both brucine solution group and B-SLN group had an inhibitory effect on the proliferation of HepG2 cells, and the inhibition rate increased with increasing of the time and the concentration of brucine, half-inhibitory concentration (IC_{50}) of brucine group in 48, 72 h were 208.5, 78.5 $mg \cdot L^{-1}$, IC_{50} of B-SLN group in 48, 72 h were 563.3, 114.9 $mg \cdot L^{-1}$. When the concentration of brucine was in the range of 125-500 $mg \cdot L^{-1}$, with increasing of the drug concentration, the cellular uptake increased from 50.2% to 71.2%; when the temperature was under the condition of 4 $^{\circ}C$ and 37 $^{\circ}C$, the cellular uptake increased from 43.0% to 55.2%; within uptake time of 30-240 min, with the incubation time increasing, the cellular uptake amount

[收稿日期] 20160618(012)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531624);黑龙江中医药中青年科技攻关项目(ZQG-039);哈尔滨市科技创新人才专项基金项目(青年科技创新人才项目)(2011RFQXS102)

[第一作者] 管庆霞, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新药的开发研究, Tel:0451-87266893, E-mail:546105832@qq.com

[通讯作者] * 吕邵娃, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础及新药开发研究, Tel:0451-87266916, E-mail:1031892056@qq.com

increased from 9.7% to 56.4%. **Conclusion:** SLN administration system can significantly improve the activity of brucine against cancer cells, B-SLN has the ability to increase cellular uptake of drugs.

[**Key words**] brucine; solid lipid nanoparticles; HepG2 cells; cytotoxicity; cellular uptake; half-inhibitory concentration

马钱子碱是马钱子的主要有效成分之一,具有较显著的抗癌、镇痛抗炎和免疫调节等作用^[1-2],但由于马钱子是剧毒药物,剂型较落后,极大地限制了其在临床上的应用,如何减少或避免上述问题已成为近年来的研究热点之一。固体脂质纳米粒(SLN)是一种新型毫微粒类给药系统,能在一定程度上降低药物的毒副作用^[3],提高药物的生物利用度,有着制备快速、方便批量生产等优点^[4],其将会在疾病的诊断、治疗及卫生保健等方面发挥重要作用^[5],是一种极具发展前景的新型药物载体^[6]。本课题组前期进行了药动学、组织分布及荧光内窥式共聚焦成像等的研究,证明马钱子碱固体脂质纳米粒(B-SLN)具有长循环作用,可增强马钱子碱的生物利用度,并且对肝具有靶向性,但 B-SLN 进入器官后能否进入细胞,并且较好地发挥其治疗作用尚不明确。因此,本实验将 B-SLN 作用于 HepG2 细胞,通过体外 HepG2 细胞毒性及摄取情况的考察,对其作用机制进行深入探讨,在一定程度上为中药纳米递药系统的研究提供参考,同时也为尚处于探索阶段的中药制剂现代化研究提供可行性参考。

1 材料

HFsafe-1200 型超净工作台(Heal Force 公司),HZQ-C 型空气浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司),CKX41 型倒置显微镜(Olympus 公司),H2050R 型离心机(湘仪仪器有限公司),GI54DS 型高压灭菌锅(Zealway 公司),SpectraMax M5 型多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司],MCO-15AC 型二氧化碳培养箱(上海旦鼎国际贸易有限公司),BD Accuri C6 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

RPMI 1640 液体培养基,10% 优级胎牛血清,二甲基亚砜和胰蛋白酶均购自美国 Hyclone 公司;磷酸盐缓冲液(PBS,武汉博士德公司),双抗(青霉素/链霉素,华北制药厂),四甲基偶氮唑盐(MTT,武汉博士德公司),马钱子碱原料药(日本和光纯药株式会社,批号 059-17),单硬脂酸甘油酯(单甘酯,天津市光复精细化工研究所),马钱子碱对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 $\geq 98\%$,批号 110706-

200505),大豆卵磷脂(卵磷脂,北京奥博星生物技术有限责任公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同马钱子碱固体脂质纳米粒(B-SLN)的制备 按单甘酯与卵磷脂的比例 1:2,药物与单甘酯的比例 1:10,称取单甘酯 50 mg 和马钱子碱 5 mg,加入无水乙醇 5 mL,超声溶解,加入处方量卵磷脂,微热构成有机相;另取 0.4% 嵌段式聚醚 F-68(F-68)的水溶液 10 mL,加热至温度与有机相相同,作为水相;用针头缓慢将有机相注入水相中,不加荧光剂标记物异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)或加入 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ FITC,温度保持在 $65 \text{ }^\circ\text{C}$,搅拌速度 $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,搅拌时间 1.5 h,浓缩至体积约 5 mL,将所得的半透明纳米乳剂在搅拌下快速混于另一低温($0 \sim 2 \text{ }^\circ\text{C}$)水相(10 mL)中,继续搅拌固化 1.5 h,即得 B-SLN 或 FITC-B-SLN 的混悬液。

2.2 B-SLN 对 HepG2 细胞毒性的分析 采用 MTT 法检测,分为空白 SLN 组(在 HepG2 细胞中加入空白 SLN),马钱子碱组(在 HepG2 细胞中加入马钱子碱溶液),B-SLN 组(在 HepG2 细胞中加入 B-SLN)。取对数生长期的 HepG2 细胞用胰蛋白酶消化,用 RPMI 1640 培养基将其制成单细胞悬液,在 96 孔细胞培养板中每孔加入约 5×10^3 个细胞,将此培养板放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$ 细胞培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后,分别加入 3 个试验组的供试品,质量浓度均为 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1 000, 2 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以不加药物培养的细胞作为对照组,每个质量浓度设 6 个平行孔。将加药后的培养板置于细胞培养箱中继续培养,分别于培养 24, 48, 72 h 后取出 96 孔板。孵育后每孔加 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT $20 \text{ } \mu\text{L}$,继续孵育 4 h,取出,小心去掉上清液,每孔加入二甲基亚砜 $150 \text{ } \mu\text{L}$,将培养板于转速为 $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床上摇动 10 min,使紫色结晶物充分溶解。用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度 A,计算细胞抑制率,结果见表 1, 2。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - (A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

经检测发现,各试验组均呈药敏阳性,且 48 h 和 72 h 组与 24 h 组比较均具有统计学意义。空白

表 1 马钱子碱对 HepG2 细胞的细胞毒性 ($n=3$)

Table 1 Cytotoxicity of brucine on HepG2 cells ($n=3$)

马钱子碱 /mg·L ⁻¹	24 h		48 h		72 h	
	A($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%	A($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%	A($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%
7.8	0.524 ± 0.041 5	9.3	0.580 ± 0.033 5 ¹⁾	11.5	0.707 ± 0.012 4 ²⁾	26.4
15.6	0.516 ± 0.036 7	10.7	0.551 ± 0.016 3 ²⁾	24.3	0.692 ± 0.023 5 ²⁾	36.4
31.2	0.511 ± 0.041 8	11.5	0.544 ± 0.050 1 ²⁾	30.3	0.638 ± 0.038 3 ²⁾	43.1
62.5	0.514 ± 0.023 2	11.0	0.547 ± 0.040 6 ²⁾	34.2	0.602 ± 0.014 7 ²⁾	49.1
125	0.499 ± 0.053 7	16.7	0.533 ± 0.031 4 ²⁾	42.4	0.549 ± 0.034 1 ²⁾	58.7
250	0.474 ± 0.064 5	23.5	0.438 ± 0.035 7 ²⁾	53.2	0.493 ± 0.028 8 ²⁾	63.7
500	0.426 ± 0.042 2	34.2	0.428 ± 0.058 9 ²⁾	56.3	0.369 ± 0.014 1 ²⁾	72.0
1 000	0.408 ± 0.042 6	35.1	0.323 ± 0.024 7 ²⁾	63.5	0.311 ± 0.025 7 ²⁾	85.5
2 000	0.303 ± 0.053 4	41.3	0.322 ± 0.043 1 ²⁾	69.3	0.204 ± 0.018 4 ²⁾	91.4

注:空白 SLN 组在 24,48,72 h 的 A 分别为 0.578 ± 0.031 3,0.616 ± 0.052 0,0.831 ± 0.017 2。48,72 h 组分别与 24 h 相同质量浓度组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 B-SLN 对 HepG2 细胞的细胞毒性 ($n=3$)

Table 2 Cytotoxicity of B-SLN on HepG2 cells ($n=3$)

B-SLN /mg·L ⁻¹	24 h		48 h		72 h	
	A($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%	A($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%	A($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%
7.8	0.545 ± 0.021 5	4.4	0.607 ± 0.024 5 ¹⁾	9.5	0.657 ± 0.015 4 ²⁾	17.4
15.6	0.534 ± 0.032 7	5.7	0.581 ± 0.023 3 ²⁾	12.3	0.642 ± 0.033 5 ²⁾	26.3
31.2	0.521 ± 0.031 8	7.5	0.564 ± 0.035 1 ²⁾	15.3	0.598 ± 0.034 3 ²⁾	34.2
62.5	0.524 ± 0.025 2	9.0	0.557 ± 0.030 6 ²⁾	23.2	0.572 ± 0.032 7 ²⁾	44.1
125	0.513 ± 0.043 7	14.7	0.543 ± 0.035 4 ²⁾	34.4	0.532 ± 0.024 1 ²⁾	55.3
250	0.484 ± 0.034 5	18.5	0.498 ± 0.023 7 ²⁾	43.2	0.483 ± 0.023 8 ²⁾	59.7
500	0.466 ± 0.062 2	19.5	0.478 ± 0.034 9 ²⁾	49.3	0.389 ± 0.024 7 ²⁾	63.0
1 000	0.438 ± 0.052 6	21.1	0.433 ± 0.034 7 ²⁾	57.5	0.301 ± 0.035 7 ²⁾	74.5
2 000	0.363 ± 0.033 4	23.3	0.362 ± 0.033 1 ²⁾	65.3	0.284 ± 0.015 6 ²⁾	87.4

注:空白 SLN 组在 24,48,72 h 的 A 分别为 0.561 ± 0.034 3,0.679 ± 0.052 1,0.751 ± 0.037 2。

SLN 组对 HepG2 细胞无抑制作用,表明载体材料对细胞无影响。各质量浓度的试验组对 HepG2 细胞增殖具有抑制作用,随药物质量浓度的增加,抑制率基本呈上升趋势,结果具有显著差异($P < 0.01$);相同质量浓度各试验组药物作用 HepG2 细胞 48,72 h 后的抑制率与 24 h 比较,抑制率升高,存在统计学差异($P < 0.05$)。说明马钱子碱组与 B-SLN 组对 HepG2 细胞增殖均具有抑制作用,呈明显的时间依赖性和剂量依赖性;B-SLN 组与马钱子碱组相比抑制率稍有下降,但对细胞仍有生长抑制作用;24 h 各质量浓度的 B-SLN 组抑制率均较低,48 h 以后抑制率逐渐升高达到和马钱子碱组相近的抑制水平,说明药物纳米化后有明显的缓释效果。根据马钱子碱和 B-SLN 作用于 HepG2 细胞的抑制率,计算半抑制浓度(IC_{50})。马钱子碱组 48,72 h 的 IC_{50} 分别为

208.5,78.5 mg·L⁻¹,B-SLN 组 48,72 h 的 IC_{50} 分别为 563.3,114.9 mg·L⁻¹。

2.3 B-SLN 的 HepG2 细胞摄取

2.3.1 荧光倒置显微镜观察细胞摄取 用培养液将 HepG2 细胞稀释成密度为 1×10^4 cfu·mL⁻¹ 的细胞悬液,接种于 12 孔细胞培养板中,在 CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后分别取所含马钱子碱质量浓度为 500,250,125 mg·L⁻¹ 的 FITC-B-SLN,FITC 溶液和空白 SLN,与细胞共孵育 24 h。实验前用 PBS 轻轻冲洗细胞表面 3 次,置于荧光显微镜下观察 HepG2 细胞对各试验组的摄取情况,见图 1。

结果显示无 FITC 标记的空白 SLN 和 FITC 溶液共孵育的细胞没有荧光出现,说明载体本身不能发光且 FITC 溶液不能进入细胞内部,排除了载体和



A. FITC; B. 空白 SLN; C. FITC-B-SLN(图 2 同)

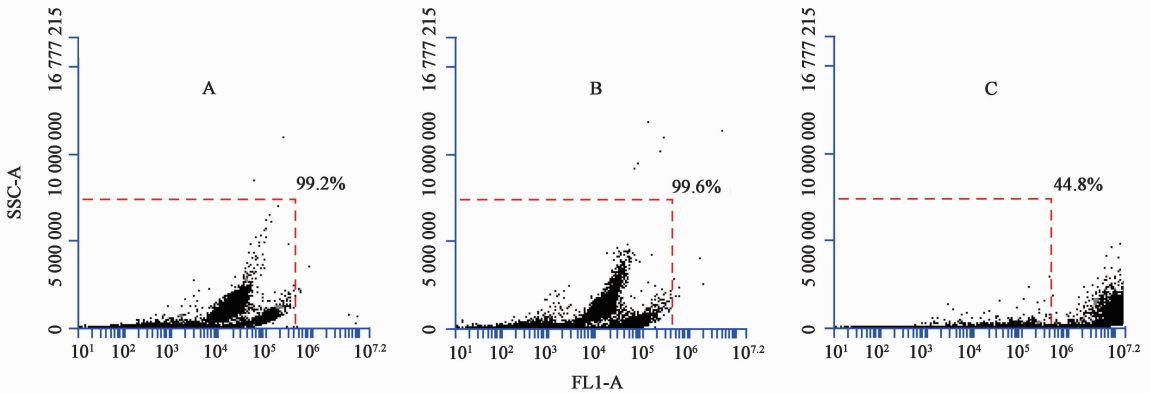
图 1 荧光显微镜观察 B-SLN 的 HepG2 细胞摄取

Fig. 1 Detection of cellular uptake of B-SLN by fluorescence microscopy

游离 FITC 的干扰。而 FITC-B-SLN 与细胞作用后可观察到荧光,细胞轮廓清晰,表明 B-SLN 能够被 HepG2 细胞摄取。

2.3.2 流式细胞仪检测细胞摄取 将细胞密度调整为 1×10^4 cfu \cdot mL⁻¹,接种于 12 孔细胞培养板上

贴壁生长。分为 FITC-B-SLN, FITC 溶液和空白 SLN,3 个试验组分别与细胞共孵育 24 h。实验前用 PBS 清洗 3 次,胰蛋白酶消化细胞,1 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,用 PBS 重悬细胞置于 2 mL 离心管中,分析细胞的摄取情况,见图 2。结果显示空白 SLN 和 FITC 溶液与 HepG2 细胞作用基本无荧光,表明空白 SLN 本身无荧光,FITC 分子在设定的孵育时间内不能进入细胞,排除了空白 SLN 和 FITC 分子对结果的影响,而 FITC-B-SLN 具有荧光,能够进入细胞。流式细胞仪的测定结果与荧光倒置显微镜结果一致,由于流式细胞仪检测灵敏度较高,因此分别从药物浓度、孵育温度和孵育时间 3 个方面探讨影响细胞摄取的因素。



FL1-A. 第一荧光通道的相对荧光强度;SSC-A. 侧向散射光强度(图 3 ~ 5 同)

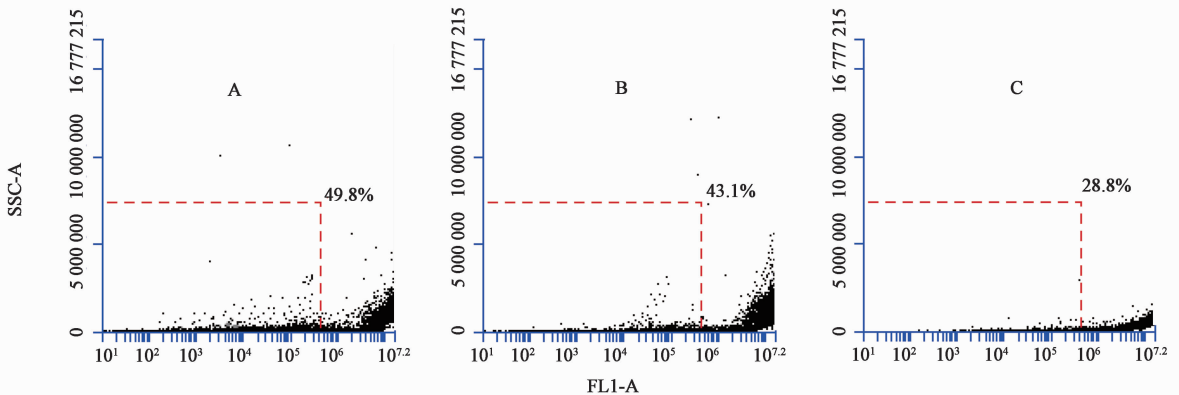
图 2 流式细胞仪检测 B-SLN 的 HepG2 细胞摄取

Fig. 2 Detection of cellular uptake of B-SLN by flow cytometry

2.4 药物质量浓度对细胞摄取的影响 细胞在 12 孔培养板中贴壁生长后,分别加入马钱子碱质量浓度为 125,250,500 mg \cdot L⁻¹ 的 FITC-B-SLN,于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 4 h,按 2.3.2 项下方法处理并收集细胞,检测,见图 3。结果显示药物质量

浓度在 125 ~ 500 mg \cdot L⁻¹ 时,HepG2 细胞对 FITC-B-SLN 的摄取量由 50.2% 增加到 71.2%,随药物质量浓度的增加,摄取量呈现逐渐升高趋势,表明细胞摄取量在一定范围内呈剂量依赖性。

2.5 温度对细胞摄取的影响 细胞在 12 孔培养板



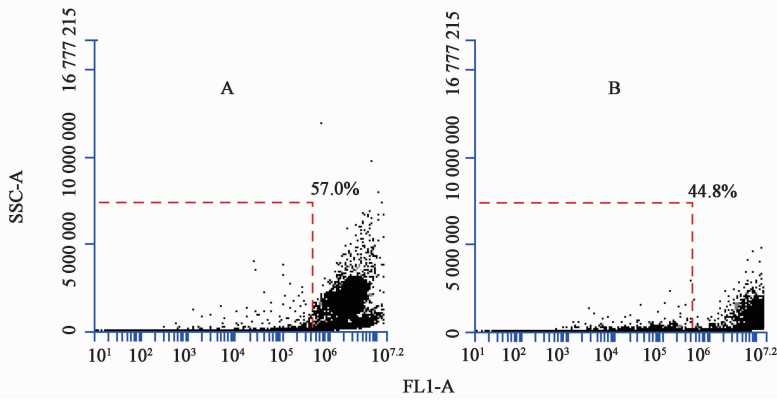
A. 125 mg \cdot L⁻¹; B. 250 mg \cdot L⁻¹; C. 500 mg \cdot L⁻¹

图 3 FITC-B-SLN 中马钱子碱质量浓度对细胞摄取影响的散点分布

Fig. 3 Scatter distribution of effect of concentration of brucine on cellular uptake of FITC-B-SLN

中贴壁生长后,加入药物质量浓度 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 FITC-B-SLN,分别于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h,按 2.3.2 项下方法处理并收集细胞,流式细胞仪测定,见图 4。结果显示温度在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下,HepG2 细

胞对 FITC-B-SLN 的摄取量分别为 43% 和 55.2%,发现于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下,细胞摄取量显著高于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ($P < 0.05$),表明细胞摄取量与温度呈比较典型的依赖性。



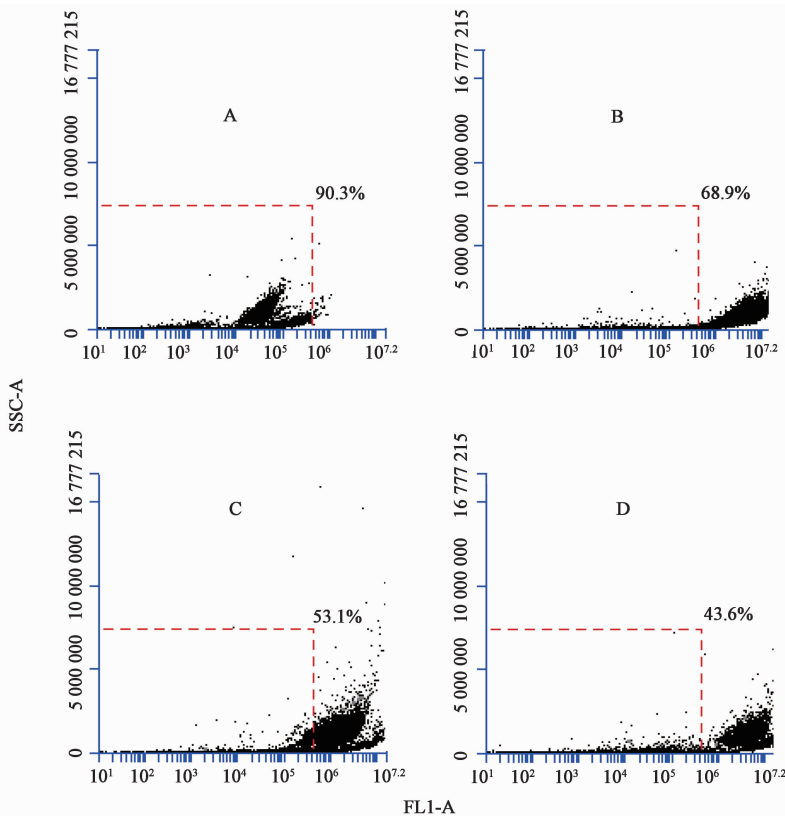
A. $4 \text{ }^\circ\text{C}$; B. $37 \text{ }^\circ\text{C}$

图 4 温度对 FITC-B-SLN 的细胞摄取影响的散点分布

Fig. 4 Scatter distribution of effect of temperature on cellular uptake of FITC-B-SLN

2.6 孵育时间对细胞摄取的影响 细胞在 12 孔培养板中贴壁生长后,加入药物质量浓度 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 FITC-B-SLN,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$ 细胞培养箱中孵育 30, 60, 120, 240 min,按 2.3.2 项下方法处理并

收集细胞,流式细胞仪测定,见图 5。结果显示孵育时间在 30 ~ 240 min 时,HepG2 细胞对 FITC-B-SLN 的摄取量由 9.7% 增加到 56.4%,随孵育时间的增加,摄取量呈现逐渐增加趋势,表明细胞摄取量在一



A. 30 min; B. 60 min; C. 120 min; D. 240 min

图 5 孵育时间对 FITC-B-SLN 的细胞摄取影响的散点分布

Fig. 5 Scatter distribution of effect of incubation time on cellular uptake of FITC-B-SLN

定范围内呈时间依赖性。

3 讨论

B-SLN 具有降低药物毒性、延长作用时间、提高生物利用度等性质。本实验通过 MTT 法检测发现马钱子碱组与 B-SLN 组对 HepG2 细胞增殖均具有抑制作用,且呈明显的时间依赖性和剂量依赖性,B-SLN 于 48 h 后抑制率逐渐升高达到和马钱子碱组相近的抑制水平,表明药物纳米化后有明显的缓释效果,为后期细胞摄取、凋亡等细胞实验提供了基础。细胞毒性试验是生物学评价体系的首选项目,MTT 法能够十分灵敏且客观地反映出受试材料对细胞的毒性程度,已成为评价药物体外细胞毒性的经典方法^[7-8]。

纳米载体的细胞摄取研究是反映细胞和纳米载体材料间相互作用情况的方法,荧光标记技术灵敏度高、选择性较好,能够广泛应用于细胞内外物质检测、组织或活体动物标记成像等^[9-10],亦可快速地进行细胞摄取的定性、定量研究。本实验通过荧光标记技术研究了 B-SLN 对 HepG2 细胞的摄取情况,发现 B-SLN 能够被 HepG2 细胞摄取,摄取量与药物质量浓度、孵育温度及孵育时间呈正相关,证明 B-SLN 具有增加药物被细胞摄取的能力,并能进入细胞内,但关于其细胞摄取机制方面有待于进一步的研究确认。

本文研究结果与前期的药动学、组织分布等结果一致,证明了 B-SLN 具有缓释性和肝靶向性,且本实验结果进一步说明 B-SLN 不仅可以靶向于肝,而且能够进入肝细胞内部发挥治疗作用,表现出优良的体外抗肿瘤活性和细胞摄取行为。由于体外细胞研究与临床应用存在一定差异,依此推至人,还应谨慎。为使其临床应用更加安全、广泛,后期将继续开展临床 B-SLN 给药系统的研究,为该方法在临床

上的大范围应用提供可靠保证。本实验不但丰富了国内外对于固体脂质纳米粒的研究内容,而且为其他毒性中药的新制剂研究提供了理论基础。

[参考文献]

- [1] DENG X K, YIN W, LI W D, et al. The anti-tumor effects of alkaloids from the seeds of *Strychnos nuxvomica* on HepG2 cells and its possible mechanism[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 106(2): 179-186.
- [2] 杨豪, 乔卫平, 郑福增. 马钱子及其制剂治疗类风湿关节炎研究进展[J]. *中医正骨*, 2007, 19(4): 71-73.
- [3] Srinath P, Vyas S P, Diwan P V. Preparation and pharmacodynamic evaluation of liposomes of indomethacin[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2000, 26(3): 313-321.
- [4] 徐元龙, 李学明, 张琪, 等. 固体脂质纳米粒的研究新进展[J]. *中国新药杂志*, 2005, 14(7): 838-843.
- [5] 蒋青锋, 陈志良, 包杰, 等. 银杏内酯纳米粒细胞毒性研究[J]. *中国医药指南*, 2010, 8(24): 23-25.
- [6] MEI Z, CHEN H, WENG T, et al. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 56(2): 189-196.
- [7] 冀会方, 刘露, 李开, 等. 鸦胆子蛋白质组成分析及其酶解物细胞毒性研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(22): 4210-4215.
- [8] 宋文植, 尹万忠, 杨欢, 等. MTT 法检测纳米金粒子体外细胞毒性的研究[J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(8): 1242-1245.
- [9] 刘艳华, 孙进, 王文萃, 等. 包载紫杉醇的透明质酸聚合物胶束细胞毒性及细胞摄取研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(21): 271-274.
- [10] 吴超柱, 徐凡, 郜炎龙, 等. 荧光标记技术在生物学和医学研究中的应用[J]. *重庆理工大学学报: 自然科学版*, 2014, 28(5): 55-62.

[责任编辑 刘德文]