

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.012

α - 亚麻酸 - 阿霉素前药的合成以及抗肿瘤活性研究 *

梁春辉¹ 郭焕利¹ 姚希梅¹ 庞薪莉¹ 周四元^{2△}

(1 西安市儿童医院 陕西 西安 710003; 2 第四军医大学药理学系药剂学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 合成具有酸敏特性的 α - 亚麻酸 - 阿霉素前体药物, 并观察其抗肿瘤活性以及对肿瘤细胞的靶向性。**方法:** 以 Boc-NHNH₂、 α - 亚麻酸、阿霉素为主要反应原料, 先后合成 Boc 保护的 α - 亚麻酰肼、 α - 亚麻酰肼和 α - 亚麻酸 - 阿霉素胺键连接物, 采用核磁共振、质谱等方法鉴定其结构; 采用 LC/MS 方法研究连接物在不同 pH 介质中的药物释放行为; 采用 MTT 法观察连接物对人肝癌细胞 HepG2、乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的毒性作用。**结果:** 在 1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)的催化作用下, 合成了 α - 亚麻酸 - 阿霉素前体药物, 波谱分析提示为目标产物。通过在体外酸性条件下水解连接物, 我们发现该连接物具有显著的 pH 值敏感性。同时在体外细胞毒性实验中, 我们发现相比于游离阿霉素, 该合成连接物 α - 亚麻酸 - 阿霉素对 HepG2、MDA-MB-231 和 MCF-7 三种肿瘤细胞具有更强的细胞毒性, 而且细胞毒性作用可被外源性 α - 亚麻酸抑制。**结论:** α - 亚麻酸 - 阿霉素连接物能经 α - 亚麻酸受体介导靶向于 α - 亚麻酸受体丰富的肿瘤细胞, 是一种潜在的新型抗肿瘤药物。

关键词: α - 亚麻酸; 阿霉素; 细胞毒性; 肿瘤靶向

中图分类号: R284; R730.5 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)27-5242-05

The Synthesis of α -Linolenic Acid-Doxorubicin Conjugate and its Antitumor Activity in Vitro*

LIANG Chun-hui¹, GUO Huan-li¹, YAO Xi-mei¹, PANG Xin-li¹, ZHOU Si-yuan^{2△}

(1 Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710003, China;

2 Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To prepare the pH-sensitive conjugate of α -linolenic acid-doxorubicin and observe its antitumor activity in vitro. **Methods:** Boc-LH, LH and L-DOX are synthesized with the catalyst (EDC·HCl) and the main raw materials: BocNHNH₂, α -linolenic acid and doxorubicin, and characterized in terms of ¹H NMR and MASS. The drugs release characteristic was performed in different pH media in vitro by the by LC/MS. The cytotoxicity effects of L-DOX on human hepatocellular carcinoma cell HepG2, human breast cancer cell line MDA-MB-231 and MCF-7 cells was measured by MTT assay. **Results:** With the help of EDC·HCl, the L-DOX was synthesized. The cytotoxicity of L-DOX on the three different tumor cells were stronger than doxorubicin at the same concentration, and could be inhibited by adding the free α -linolenic acid. **Conclusion:** L-DOX could be targeted to tumor cells via α -linolenic acid receptor. It could be a new potential anticancer drug.

Key words: α -linolenic acid; Doxorubicin; Cytotoxicity; Tumor targeting

Chinese Library Classification(CLC): R284; R730.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)27-5242-05

前言

在目前的临床治疗肿瘤的方法中, 化学疗法和手术治疗是两种最重要的治疗手段, 其中化学疗法在手术后期康复中更是尤为重要, 然而在实际应用中我们面临着两大难题: 一是在化学药物治疗中几乎都会引起严重的毒副作用。二是肿瘤细胞自身会对化疗药物产生多药耐药性 (multidrug resistance, MDR)。近年来, 为了解决以上难题, 药物工作者们提出一个全新的递药系统概念: 靶向药物传递系统(targeting drug delivery system,

TDDS)^[1], 作为一种全新的递药手段, 其在抗肿瘤药物传递中已经显示出了良好的成效。阿霉素又称多柔比星(doxorubicin), 是一种十分有效的抗肿瘤药物, 主要用来治疗实体瘤, 如乳腺癌、卵巢癌、肺癌、甲状腺癌、肝癌、肉瘤等。但由于其对心脏、骨髓毒性大从而限制了其在临床上的应用^[2-5]。

α - 亚麻酸(α -Linolenic Acid, α -LNA, 全顺式 9,12,15- 十八碳三烯酸), 是人类每天的必须营养素, 它是一种主要存在于蔬菜油中的多不饱和脂肪酸, 是我们人体中细胞膜和生物酶的基本组成物质。科学研究发现 α - 亚麻酸的主要很强的药理作用:

* 基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2012KTCL03-18)

作者简介: 梁春辉(1975-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 靶向制剂和药物代谢动力学, 电话: 029-84776783, E-mail: 1140917672@qq.com

△通讯作者: 周四元, 电话: 029-84776783, E-mail: 108253121@qq.com

(收稿日期: 2014-02-10 接受日期: 2014-03-08)

其中具有明显的降血压、降血脂以及抗炎、抗血栓、抗心律失常等作用^[6-8],同时它对人体预防心脑血管病的发生还具有积极作用^[9]。随着研究的深入,近年来,研究者又相继发现 α -亚麻酸还具有预防乳腺癌的发生^[10]。同时其还可以在一定程度抑制肿瘤细胞的活性,从而可以抑制癌症的发生和转移^[11]。最近有报道称,在大多数的肿瘤细胞表面都存在能够与不饱和脂肪酸特异结合的靶点,有科研工作者将抗肿瘤药物与一些不饱和脂肪酸通过化学键连接,结果这些抗肿瘤药物显示出一定的肿瘤细胞靶向性^[12,13]。因此我们实验设计是通过化学键将阿霉素与 α -亚麻酸连接,可以使阿霉素直接靶向至肿瘤细胞,从而可以选择性的杀死肿瘤细胞,避免对人体正常组织器官的损伤。我们知道设计药物递送至肿瘤细胞内需要释放出游离药物才能真正的发挥抗肿瘤作用,然而如何去释放药物呢?在此我们根据肿瘤组织微环境对化学桥连键进行设计。

科学研究表明在人体血液中其 pH 值偏中性为 7.4,而在肿瘤组织微环境以及肿瘤细胞内其 pH 值偏酸性为 ≤ 6 。同时据报道发现脲键在 pH 值偏中性的环境下稳定,而当 $\text{pH} \leq 6$ 的环境中会发生迅速断裂^[14-18]。根据以上人体生理特点以及脲键的独特酸敏感性药学者们制备出了具有酸敏特性的抗肿瘤药物,从而使其可特异地释放到肿瘤偏酸性环境中,进而发挥抗肿瘤作用^[19]。因此本文拟通过脲键将 α -亚麻酸与阿霉素连接,合成具有主动靶向及对肿瘤细胞溶酶体微环境(溶酶体和内涵体, $\text{pH} < 5$) 有特异性响应的 α -亚麻酸-阿霉素脲键连接物,采用质谱、核磁共振等方法对其进行结构鉴定,同时应用 LC/MS 对其体外释药特性进行评估以及利用 MTT 法对体外抗肿瘤活性进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市科瑞仪器有限公司);SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海雅荣生化设备仪器有限公司);DK-D 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣公司);Model-680 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-Rad Laboratories);HY-5 回旋式振荡器(江苏省金坛市宏华仪器厂);倒置相差显微镜(德国 LEICA 公司);培养箱(Thermo Forma 371);Waters 2695 高效液相色谱仪(Waters 公司),Waters Quatro-premier 型串联四级杆质谱仪(Waters 公司),Masslynx 4.1 软件操作系统;INOVA-400 MHz 型超导核磁共振仪(美国 Varian 公司)。

1.2 实验材料

阿霉素(浙江海正药业股份有限公司); α -亚麻酸(上海新量化工试剂有限公司);EDC·HCl(纯度 99%, Shanghai Medpep Co.,Ltd);三氟乙酸(98%, Sigma);BocNHNH₂(98%, Alfa Aesar);其余试剂均为分析纯。人肝癌细胞 HepG2、乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 购自上海生化所细胞库;RPMI1640 培养液(Sigma 公司);胰酶(北京利科恒达科贸有限公司);MTT(北京鼎国生物技术有限责任公司);特级胎牛血清(天津市源洋生物制品科技有限责任公司);96 孔培养板(加拿大 JET Biochemicals Int, Inc);6 空培养板(加拿大 JET Biochemicals Int, Inc)。

1.3 实验方法

1.3.1 Boc 保护的 α -亚麻酰肼(Boc-LH)的合成 在干燥的圆底烧瓶中加入 290 mg α -亚麻酸、605.4 mg EDC·HCl、186 mg BocNHNH₂ 和 9 mL DMF,室温下反应 12 h。TLC 检测,待反应完全后停止反应。向反应液中加入 90 mL 蒸馏水,用乙酸乙酯(100 mL $\times$ 2)萃取,收集乙酸乙酯层,用盐水(30 mL $\times$ 2)洗二次,用无水硫酸钠干燥,减压蒸干溶剂,得黄色油状液体。将黄色油状液体以环己烷-乙酸乙酯(2:1)为洗脱剂,用硅胶柱层析分离纯化。得到浅黄色油状液体 348.8 mg。产率:85.3%。

1.3.2 α -亚麻酰肼(LH)的合成 将 322 mg Boc-LH 加入到 100 mL 干燥的圆底烧瓶中,加入 25 mL 二氯甲烷,6 mL 三氟乙酸,室温反应 15 min。TLC 检测,待反应完全后停止反应。用饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH 为 7,然后加入 100 mL 二氯甲烷,最后用水(100 mL $\times$ 2)洗涤。得到的有机层用无水硫酸钠充分干燥,然后蒸馏得深黄色液体。将上述深黄色液体以二氯甲烷-甲醇(30:1)为洗脱剂,用硅胶柱层析分离纯化。得到 192.7 mg 黄色粘稠液体。产率:80.2%。

1.3.3 α -亚麻酸-阿霉素连接物(L-DOX)的合成 将 234.8 mg 阿霉素盐酸盐用 25 mL 甲醇溶解,再加入 12 μ L 三氟乙酸和 192.7 mg LH,室温反应 12 h。待反应完全后停止反应,减压蒸除溶剂,得粗产物。将粗产物用硅胶柱层析分离纯化,以二氯甲烷-甲醇(5:1)为洗脱剂,并在洗脱剂中加入少量三乙胺。得到 163.5 mg 暗红色固体。产率:49.4%。

1.3.4 α -亚麻酸-阿霉素连接物(L-DOX)的体外释药研究 根据中国药典规定方法配制三种不同的磷酸盐缓冲溶液,分别是: pH5.0、pH6.5 和 pH7.4 的,考察目标连接物 L-DOX 的释药性能。将 100 μ g/mL 的连接物溶于 pH 为 5.0 的醋酸盐缓冲液以及 pH 为 6.5 和 7.5 的磷酸盐缓冲液中,37 $^{\circ}$ C 水浴摇床孵育,并于以下时间点 0 h、0.5 h、1 h、1.5 h、3 h、5 h、7 h 和 10 h 进行取样,分别取出 20 μ L 注入 HPLC-MS-MS 进行检测分析。

1.3.5 α -亚麻酸-阿霉素连接物(L-DOX)的细胞毒性 实验分为以下三组:阴性对照组、阿霉素和 α -亚麻酸-阿霉素连接物组。首先用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养肿瘤细胞,在其处于对数生长期且生长状态良好的情况下,用 0.25% 胰蛋白酶消化成单个细胞,然后离心使细胞沉淀,再用 PBS 洗涤,用含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液稀释成单个细胞悬液,然后按每孔 3000 个细胞的密度接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μ L。最后将细胞培养板放入培养箱中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、及饱和湿度条件下培养 24 h 后分别加入阿霉素、 α -亚麻酸-阿霉素,使终质量浓度分别为 0.08、0.4、2、10、50 μ M(目标连接物折算成阿霉素的等价浓度),再培养 48 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μ L,然后继续放入孵箱内培养 4 h,随后小心弃培养液,每孔加入 150 μ L 的 DMSO,最后用酶联免疫检测仪在 490 nm 条件下测定吸光度值(A)。根据抑制率 = $(1 - A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$ 计算得出抑制率,以抑制率对药物浓度作图分析。

1.3.6 外源性 α -亚麻酸对 α -亚麻酸-阿霉素连接物(L-DOX)细胞毒的影响 细胞培养方法如方法 1.3.5。96 空板制备好后分别在各组中加入含有 0.4、2 和 10 μ M 游离 α -亚麻酸阻断 α -亚麻酸受体,而 α -亚麻酸-阿霉素脲键连接物的药物终浓度

为 10 μM (连接物折算成阿霉素的等价浓度), 培养 48 h 后, 用酶联免疫检测仪在 490 nm 条件下测定吸光度值(A), 以存活率对药物浓度作图。

2 结果

2.1 α -亚麻酸-阿霉素连接物的合成路线

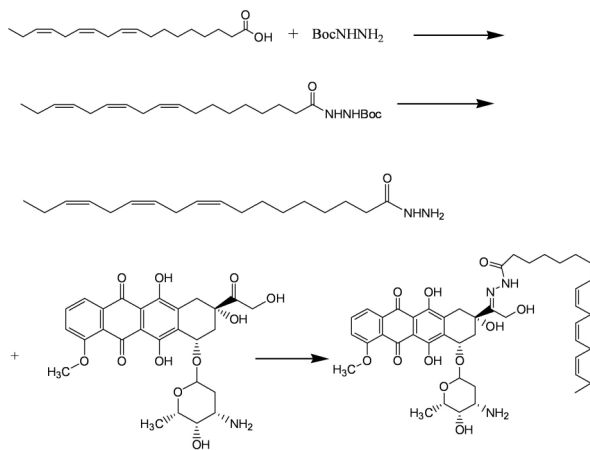


图 1 α -亚麻酸-阿霉素连接物(L-DOX)的合成路线

Fig. 1 Reaction route for the synthesis of DOX-hyd-LNA

2.2 Boc 取代的 α -亚麻酰肼(Boc-LH)的结构表征

图 2 为 Boc 保护的 α -亚麻酰肼的质谱图, 其准分子离子峰为 391(M⁺)。图 3 是以氘代氯仿为溶剂测定 Boc 保护的 α -亚麻酰肼核磁共振氢谱图(¹H NMR)。由图可知: δ 5.28-5.40 (6 H, m), 2.81 (4 H, s), 2.02-2.10 (4 H, m), 1.64-1.66 (2 H, m), 1.47 (9 H, s, Boc), 1.31-1.39 (10 H, m), 0.98 (3 H, t, CH₃, J=7.4 Hz) ppm。

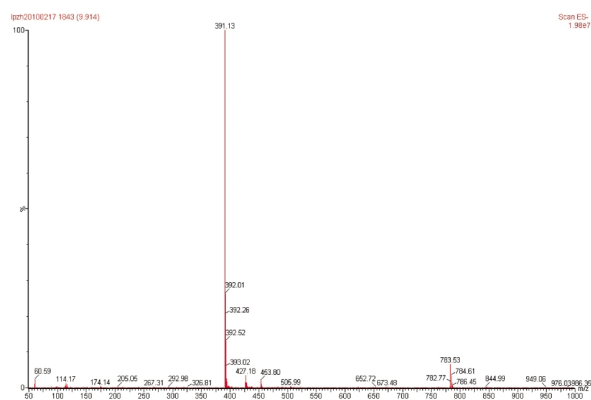


图 2 Boc 取代的 α -亚麻酰肼(Boc-LH)的质谱图

Fig. 2 LC-MASS spectra of the protection of Boc alpha linolenic acid hydrazide

2.3 α -亚麻酰肼(LH)的结构表征

图 4 为 α -亚麻酰肼(LH)的质谱图, 其准分子离子峰为 293(M⁺)。图 5 是以氘代氯仿为溶剂测定 α -亚麻酰肼核磁共振氢谱图(¹H NMR)。由图可知: δ 5.28-5.43 (6 H, m), 2.81 (4 H, s), 2.03-2.10 (4 H, m), 1.63 (2 H, s), 1.24-1.31 (10 H, m), 0.97 (3 H, t, CH₃, J=7.6 Hz) ppm。

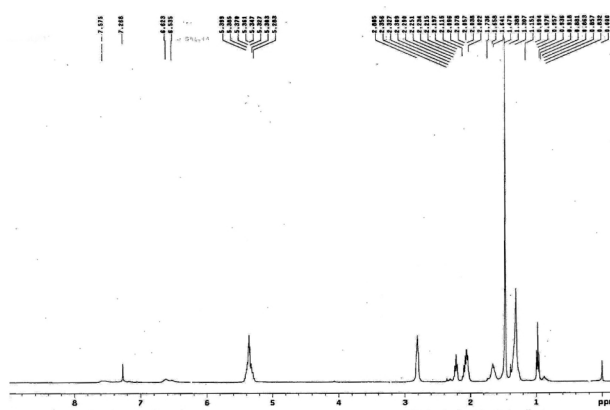


图 3 Boc 保护的 α -亚麻酰肼的 ¹H NMR 图

Fig. 3 ¹H NMR spectra of the protection of Boc alpha linolenic acid hydrazide

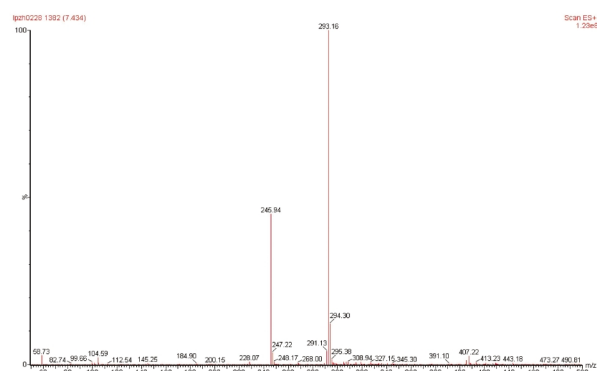


图 4 α -亚麻酰肼(LH)的质谱图

Fig. 4 LC-MASS spectra of Alpha linolenic acid hydrazide (LH)

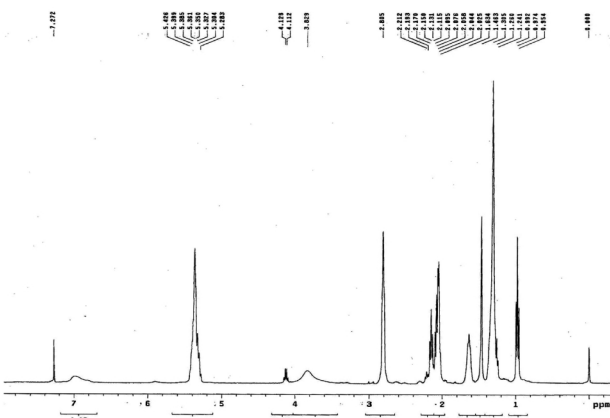


图 5 α -亚麻酰肼的 ¹H NMR 图

Fig. 5 ¹H NMR spectra of alpha linolenic acid hydrazide

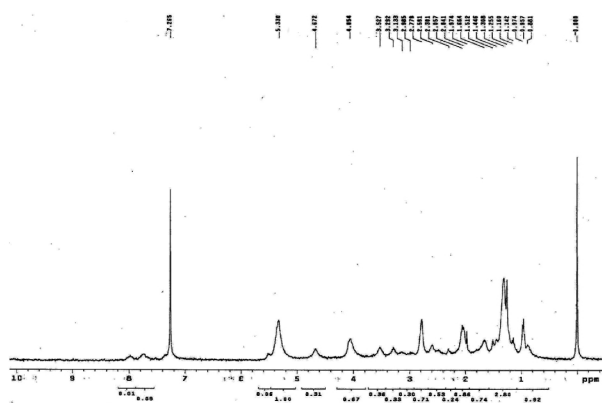
2.4 α -亚麻酸-阿霉素腙键连接物(L-DOX)的结构表征

图 6 为 α -亚麻酸-阿霉素腙键双效前体药(L-DOX)的质谱图, 准分子离子峰为 818(M⁺)。图 5 是以氘代氯仿为溶剂测定 α -亚麻酸-阿霉素腙键双效前体药的核磁共振氢谱图(¹H NMR)。由图可知: δ 5.12-5.60 (9 H, m), 3.82-4.21 (7 H, m), 3.30-3.53 (3 H, m), 2.60-2.78 (6 H, m), 2.41-2.58 (5 H, m), 1.97-2.06 (5 H, m), 1.66-1.90 (3 H, m), 1.14-1.66 (14 H, m), 0.92 (3 H, t, CH₃, J=6.8 Hz) ppm。



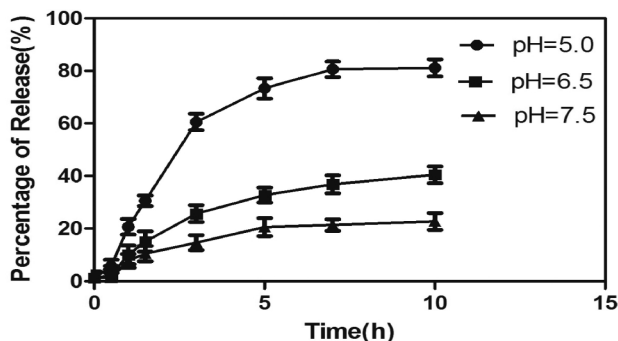
图 6 α-亚麻酸-阿霉素(L-DOX)的质谱图

Fig. 6 LC-MS spectra of α-linolenic acid-doxorubicin (L-DOX)

图 7 α-亚麻酸-阿霉素的 ¹H NMR 图Fig. 7 ¹H NMR spectra of α-linolenic acid-doxorubicin (L-DOX)

2.5 α-亚麻酸-阿霉素脰键连接物(L-DOX)的体外释药特性

L-DOX 的释药特性如图 8 所示。由图中我们可以看出,在三种不同 pH 值的磷酸缓冲液中,L-DOX 药物释放行为表现出明显的 pH 值依赖性,其中在 pH 7.4 的缓冲液中,经过 5h 后我们可以看出 L-DOX 的释药量只有约 18.6%,而同样经过 5h 后,在 pH 6.5 的缓冲液中 L-DOX 的释药量为 31.8%,而当 pH 下降为 5.0 的时候 L-DOX 的释药量陡增为 76.1%。从以上结果我们可以明显的看出 L-DOX 具有很强的 pH 值敏感的释药特性。这其中主要原因正是因为随着 pH 降低,其起桥连作用的脰键则更容易降解,从而释放出阿霉素,而在中性介质中脰键较稳定,故而有相对很少的阿霉素得到释放。由此我们可以得出在溶酶体 pH 介质中,L-DOX 的释药速度很快,而在血液 pH 值介质中 L-DOX 相对较稳定。

图 8 不同 pH 条件下 L-DOX 的体外释药曲线(n=3, $\bar{x} \pm SD$)Fig. 8 DOX release profiles from the L-DOX in different pH medium (n=3, $\bar{x} \pm SD$)

2.6 α-亚麻酸-阿霉素连接物(L-DOX)的细胞毒性

以阿霉素为阳性对照,用 MTT 法观察 α-亚麻酸-阿霉素连接物的体外抗肿瘤活性,绘制细胞抑制率曲线,评价药物的体外细胞毒性。从结果可以看出,对于三种不同的肿瘤细胞,α-亚麻酸-阿霉素连接物的抗肿瘤作用效果均强于游离阿霉素,且具有明显的药物浓度依赖性。

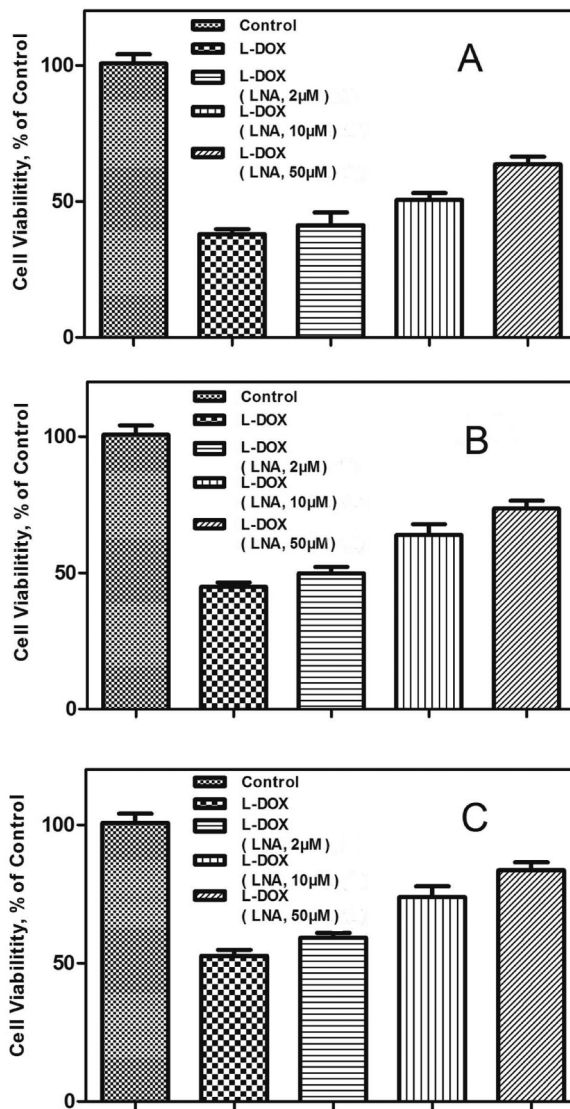


图 9 阿霉素(DOX),α-亚麻酸-阿霉素连接物(L-DOX),在 48 h 内对 HepG2 (A)、MDA-MB-231 (B) 和 MCF-7 (C) 的细胞毒性

Fig. 9 The cytotoxicities of DOX and L-DOX on HepG2 cells (A)、MDA-MB-231 cells (B) 和 MCF-7 cells (C) in 48 h in vitro

2.7 外源性 α-亚麻酸对 α-亚麻酸-阿霉素连接物(L-DOX)细胞毒性的影响

外源性 α-亚麻酸对 α-亚麻酸-阿霉素连接物细胞毒性的影响如图 10 所示,从图中我们可以看出,α-亚麻酸-阿霉素连接物对三种肿瘤细胞的细胞毒性都会因外源性 α-亚麻酸的加入而显著减弱,且呈现出一定的浓度依赖性。提示 α-亚麻酸-阿霉素通过 α-亚麻酸受体介导进入肿瘤细胞,从而说明连接物 α-亚麻酸-阿霉素具有一定的肿瘤主动靶向性。

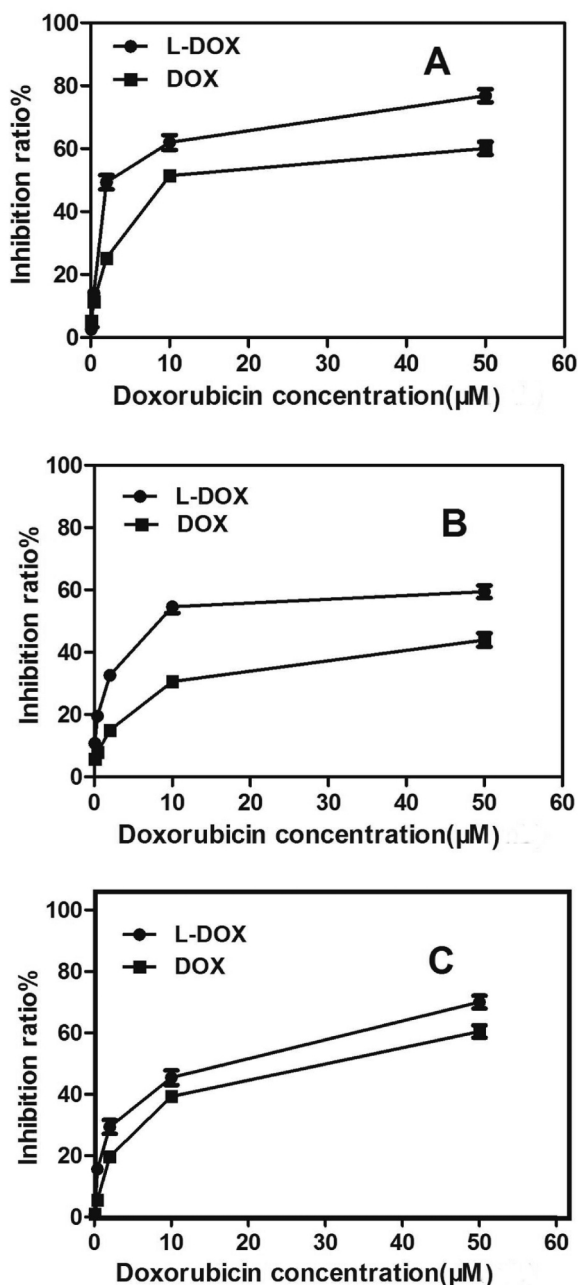


图 10 外源性 α -亚麻酸对 α -亚麻酸-阿霉素(L-DOX)连接物细胞毒的影响。A- HepG2 细胞;B- MDA-MB-231 细胞;C- MCF-7 细胞

Fig. 10 The inhibitory effects of free α -linolenic acid on the cytotoxicities of L-DOX on HepG2 cells(A), MDA-MB-231 cells(B) and MCF-7 cells(C)

3 讨论

科学研究表明,合成的叶酸-药物连接物都会与肿瘤细胞膜表面的叶酸受体发生特异性结合,然后其会在细胞膜表面形成多处凹陷,进而形成内涵体,而内涵体由于膜质子泵的作用使其内部 pH 急剧下降,一般 pH 值会小于 5,这样就会使叶酸-药物复合物的结构发生改变,使得药物从复合物上解离,然后被释到细胞内发挥抗肿瘤作用^[20]。同时王玉强等人合成的 DHA-阿霉素脘键连接物在治疗黑色素瘤裸鼠模型已展示出了很好的抗肿瘤活性^[21]。根据以上研究基础理论,我们设计合

成了 α -亚麻酸-阿霉素脘键连接的双效前体药,预计该双效前体药有双重的功能,一是,通过其头部的 α -亚麻酸能与肿瘤部位 α -亚麻酸受体选择性的结合,从而具有肿瘤靶向性。二是,通过脘键在正常生理条件以及血液中稳定,而在肿瘤组织以及肿瘤细胞内涵体的偏酸环境易发生断裂的特点,使其具有 pH 值敏感性。所以该连接物将会有选择性的在肿瘤部位发生断裂,进而释放出阿霉素,发挥抗肿瘤作用。

体外酸性模拟实验结果表明, α -亚麻酸-阿霉素脘键连接在血液循环及肿瘤细胞外环境稳定,而在肿瘤细胞内涵体的酸性环境中将 DOX 释放出来,进而发挥抗肿瘤作用。同时体外细胞毒性实验结果表明, α -亚麻酸-阿霉素连接物对三种不同肿瘤细胞显示出比阿霉素更强的细胞毒性,这主要是因为该连接物通过 α -亚麻酸受体介导进入肿瘤细胞,并且能够有效释放出游离阿霉素,同时我们推测该靶向药物也会在某种程度上可以逆转部分多要耐药,从而增加了药物在细胞内的蓄积,使其抗肿瘤作用增强。为了进一步证实该合成连接物进入肿瘤细胞是由 α -亚麻酸受体介导作用。我们通过观察在培养基中加入外源性 α -亚麻酸后,对其细胞毒性是否会有影响。结果我们看出 α -亚麻酸-阿霉素连接物对三种肿瘤细胞的细胞毒性都明显降低。这主要是由于外源性游离的 α -亚麻酸竞争性的将 α -亚麻酸受体占据,使得 α -亚麻酸-阿霉素连接物不能通过受体介导进入细胞。结果很好的证明该合成连接物是通过细胞膜表面的 α -亚麻酸受体介导的内吞进入肿瘤细胞的,然后该连接物分布于细胞内的酸性细胞器(如内涵体和溶酶体)中,进而脘键发生断裂,释放出游离阿霉素而发挥杀伤肿瘤作用。

本实验合成了 α -亚麻酸-阿霉素连接物,通过体外酸水解实验证明目标连接物具有明显的 pH 值敏感性。同时实验还研究了目标连接物的体外抗肿瘤细胞活性以及肿瘤靶向性,结果证实了 α -亚麻酸-阿霉素连接物可经 α -亚麻酸受体介导的内吞途径靶向肿瘤细胞,达到靶向作用,并且可以有效释放出阿霉素,提高抗肿瘤活性,降低毒副作用。

参考文献(References)

- [1] Huynh NT, Roger E, Lautram N, et al. The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: Passive versus active targeting [J]. *Nanomedicine*, 2010, 5(9): 1415-1433
- [2] Reddy JA, Allagadda VM, Leamon CP. Targeting therapeutic and imaging agents to folate receptor positive tumors [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2005, 6(2): 131-150
- [3] Drimal J, Zurova-Nedelceva J, Knezl V, et al. Cardiovascular toxicity of the first line cancer chemotherapeutic agents: doxorubicin, cyclophosphamide, streptozotocin and bevacizumab [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2006, 27 (Suppl 2): 176-179
- [4] Fojo T, Coley HM. The role of efflux pumps in drug-resistant metastatic breast cancer: new insights and treatment strategies [J]. *Clin. Breast Cancer*, 2007, 7(10): 749-756
- [5] Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters[J]. *Nature*, 2007, 446(7137): 749-757
- [6] Lanzmann-Petithory D. Alpha-linolenic acid and cardiovascular diseases[J]. *J Nutr Health Aging*, 2001, 5(3): 179-183
- [7] Gwendolyn Barceló -Coblign, Eric J, Murphy. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels [J]. *Progress in Lipid Research*, 2009, 48(6): 355-374 (下转第 5252 页)

- [8] 韦华梅, 闫腾蛟, 王剑波. 正交实验优选槐角总黄酮的提取工艺及不同来源槐角中总黄酮的含量测定[C]. 第二届中国西部药物分析学术研讨会论文集, 西安, 2010, 10: 213
Wei Hua-mei, Yan Teng-jiao, Wang Jian-bo. Optimum extracting technology for total flavonoid from Fructus Sophorae by orthogonal test and the content determination of total flavonoids in Fructus Sophorae from different sources [C]. The Second Western China Symposium on Pharmaceutical Analysis, Xi'an, 2010, 10: 213
- [9] 邱宏聪, 李茂, 李燕靖. 白花银背藤抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 207-208
Qiu Hong-cong, Li Mao, Li Yan-jing. Study on Anti-inflammatory effect of Argyreia seguinii [J]. China Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(9): 207-208
- [10] Sung TS, La JH, Kim Tw, et al. Alteration of nitrenergic neuromuscular transmission as a result of acute experimental colitis in rat[J]. J Veteri Sci, 2006, 7(2): 143
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2006: 353
Chen Qi. Methodology in pharmacological study on TCM [M]. Beijing: People hygiene press, 2006: 353
- [12] 王秋菊, 吕娟, 盛丽, 等. 化痔片的抗炎镇痛及抗直肠溃疡作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(4): 60-63
Wang Qiu-ju, Lv Juan, Sheng Li, et al. Anti-inflammatory, Analgesic and relieving rectal ulceration effects of the eliminating hemorrhoids tablet [J]. China Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2009, 15(4): 60-63
- [13] Ialenti A, Ianaro A, Moncada S, et al. Modulation of acute anti-inflammation by endogenous nitric oxide [J]. Eur J Pharmacol, 1992, 211: 177
- [14] Iuvone T, Carnuccio R, Dirosa M. Modulation of granuloma formation by endogenous nitric oxide[J]. Eur J Pharmacol, 1994, 265 (122): 89
- [15] 王永红, 龙晓莉, 何菲, 等. 槐角总黄酮对高脂血症大鼠降血脂及抗氧化能力的实验研究 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(22): 2677-2681
Wang Yong-hong, Long Xiao-li, He Fei, et al. Study of total flavonoid from fructus sophorae on lipid-lowering in hyperlipidemic rats and its antioxidant capacity [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2009, 30(22): 2677-2681

(上接第 5246 页)

- [8] K Prasad SV, Mantha SV, Muir SD, et al. Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low alpha-linolenic acid[J]. Atherosclerosis, 1998, 136(2): 367-375
- [9] Paul Wilkinson, Clare Leach, Eric E, et al. Influence of α -linolenic acid and fish-oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype [J]. Atherosclerosis, 2005, 181(1): 115-124
- [10] V Klein, V Chajek A, E Germain, et al. Low alpha-linolenic acid content of adipose breast tissue is associated with an increased risk of breast cancer[J]. European Journal of Cancer, 2000, 36(3): 335-340
- [11] Pizer, ES Lax, F Kuhajda, et al. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma: correlation with cell proliferation and hormone receptors[J]. Cancer, 1998, 83(3): 528-537
- [12] Bemelmans WJ, Broer J, Feskens EJ, et al. Effect of an increased intake of alpha-linolenic acid and group nutritional education on cardiovascular risk factors: the mediterranean alpha-linolenic enriched groningen dietary intervention study[J]. Am J Clin Nutr, 2002, 75(2): 221-227
- [13] Jaracz S, Chen J, Kuznetsova LV, et al. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates [J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13(17): 5043-5054
- [14] Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 47(1): 113-131
- [15] Ulbrich K, Subr V. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(7): 1023-1050
- [16] Yoo HS, Lee EA, Park TG. Doxorubicin-conjugated biodegradable polymeric micelles having acid-cleavable linkages [J]. J Control Release, 2002, 82(1): 17-27
- [17] Hrubý M, Konák C, Ulbrich K. Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin [J]. J Control Release, 2005, 103(1): 137-148
- [18] Bae Y, Jang WD, Nishiyama N, et al. Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery[J]. Mol Biosyst, 2005, 1(3): 242-250
- [19] Chytil P, Etrych T, Konák C, et al. New HPMA copolymer-based drug carriers with covalently bound hydrophobic substituents for solid tumour targeting[J]. J Control Release, 2008, 127(2): 121-130
- [20] Reddy JA, Low PS. Enhanced folate receptor mediated gene therapy using a novel pH-sensitive lipid formulation [J]. J Control Release, 2000, 64(1-3): 27-37
- [21] Yuqiang Wang, Lianfa Li, Wei Jiang, et al. Synthesis and preliminary antitumor activity evaluation of a DHA and doxorubicin conjugate[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006, 16(11): 2974-2977