

聚苹果酸 - 聚乙二醇 - 叶酸纳米共聚物的合成和生物活性的研究 *

陶阳春 李 飞 范 黎 成 冲 乔友备 李 伟 段 晓 吴 红[△]

(第四军医大学药学院药物化学与药物分析教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:制备聚苹果酸-聚乙二醇-叶酸(PMLA-PEG-FA)纳米共聚物,为构建多功能靶向药物转运系统提供前期工作。方法:配体叶酸(FA)通过 α -羟基- ω -醛基聚乙二醇(HO-PEG-CHO)以腙键连接在经过水合肼修饰的聚苹果酸的主链上。核磁共振光谱表征纳米共聚物的结构,动态透析法研究腙键响应不同 pH 值的断键特性,监测不同 pH 值共聚物中叶酸的稳定性。并采用 SM-CC-7721 人体肝癌细胞测定该纳米共聚物的细胞毒性。结果:1、经核磁共振表征 PMLA-PEG-FA 共聚物合成完成。2、在 pH5.5、pH6.5 及 pH7.4 的 PBS 缓冲体系中,6h 后配体叶酸累积释放率分别为 88.1%、85.3%和 41.6%。3、MTT 实验证实 PMLA-PEG-FA 无毒性。结论:PMLA-PEG-FA 有望成为智能靶向药物载体。

关键词 聚苹果酸 腙键 纳米共聚物 主动靶向 pH 响应

中图分类号:R944.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)21-4019-04

Folated-decorated Poly (β -malic acid)-poly (ethylene glycol) Nano-copolymers: Synthesis and Biological Evaluation*TAO Yang-chun, LI Fei, FAN Li, CHENG Chong, QIAO You-bei, LI Wei, DUAN Xiao, WU Hong[△]

(Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To prepare the folated-decorated poly (β -malic acid)-poly (ethylene glycol) nano-copolymers (abbreviated as PMLA-PEG-FA) which is to provide a new type of drug carrier for anticancer drug delivery system. **Methods:** The structure of this copolymer was confirmed by ¹H-NMR. Moreover, the FA conjugation efficiency and FA release property were determined. The cytotoxicity was assessed by using human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells as in vitro cell model. **Results:** 1. The copolymer was prepared successfully. 2. In vitro FA release from PMLA-PEG-FA conjugate occurred at a faster rate at acidic pH compared with neutral pH(7.4). After 6h of incubation at pH 5.5, pH 6.5 and pH7.4 the released free FA was about 88.1%, 85.3% and 41.6%. **Conclusion:** PMLA-PEG-FA nanocopolymer is expected to be used as an intelligent active-targeting drug carrier.

Key words: Poly (β -malic acid); Hydrazone bond; Nanocopolymer; Active targeting; pH response

Chinese Library Classification: R944.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)21-4019-04

前言

1979 至 1981 年间,Vert 和 Lenz 首次提出聚苹果酸[poly (β -malic acid) PMLA] 有望用于药物转运和小分子前药的设计,并进行了聚苹果酸的合成^[1]。聚苹果酸可通过生物发酵和化学合成的方法制得。由于化学合成较生物发酵具有分子量大,成本低,可控性好等特点,本课题选用化学合成的方法制得聚苹果酸。

聚苹果酸具有活性基团羧基,可与药物分子连接形成前药,引入靶向分子可制得具有靶向效果的药物载体。近年来已有大量文献报导聚苹果酸可作为抗肿瘤药物载体^[2]。

尽管很多药物运载系统表现出了相当好的肿瘤靶向性,通过抗原-抗体、受体-配体之间特异性结合将药物主动靶向至肿瘤细胞表面^[3-5],但由于载体与靶细胞结合后入胞能力较弱,并不能提供足够高的胞内药物浓度^[6,7],而细胞毒性药物必须进入细胞才能发挥作用,因而无法有效抑制肿瘤细胞的生长^[8,9];

且载体在胞外释放的药物扩散后有可能重新分布到正常组织,降低靶向药物的特异性。

因此我们构想选用聚苹果酸为基材,可赋予前药良好的生物相容性和体内降解性^[10-12]。并引入一些能够协助载体进行高效入胞的生物分子^[13-15]。可在聚苹果酸主链上分别键合不同长度的 PEG 链和抗肿瘤药物。利用不同长度的 PEG 链同时运载配体、生物素、单克隆抗体或靶向分子,使它们互不干扰。本研究将叶酸通过长链 PEG 以酸敏连接臂连接在聚苹果酸上,预想在肿瘤部位酸性环境中叶酸迅速脱离载体,露出功能分子达到快速入胞的效果。大量文献中报导靶向分子通过酰胺键或者酯键与药物载体键合,其在生理 pH 和肿瘤细胞外弱酸环境中的稳定性较好^[16,17],本课题组在前期工作中用酯键键合叶酸制备得到叶酸介导的普鲁兰多糖-阿霉素聚合物前药,在体外叶酸稳定性研究中,叶酸在 pH5.0 的环境中 10 h 内的累积释放率为 11%,稳定性较好。因此,本研究选用在弱酸环境中更易断裂的腙键作为酸敏部位^[18],将聚苹果酸通过酸性敏感基团腙键

* 基金项目:国家自然科学基金(30970788)

作者简介:陶阳春(1988-),男,硕士研究生,主要研究方向:聚合物药物载体。Tel:15249203266, E-mail:tyangchun@gmail.com

[△]通讯作者:吴红,电话:029-84777743, E-mail:hongwuxa@hotmail.com

(收稿日期:2012-02-23 接受日期:2012-03-18)

键合带有靶向分子的醛基 PEG 链(长链 PEG),以达到在肿瘤部位酸性环境长链 PEG 解离的效果。

本研究作为这个构想的一部分,采用经过水合肼修饰后带有酰肼键的聚苹果酸为纳米共聚物的主链,通过腙键键合醛基-聚乙二醇-叶酸(CHO-PEG-FA)(图 1),探讨该纳米共聚物的靶向分子叶酸在不同 pH 环境中的稳定性,为上述构想提供工作基础。

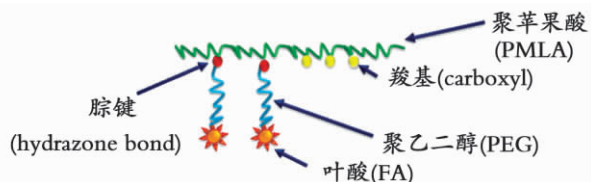


图 1 聚苹果酸-聚乙二醇-叶酸纳米共聚物模型

Fig.1 The model of PMLA-PEG-FA

1 材料与方法

1.1 实验试剂和仪器

L-天冬氨酸、叶酸、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP)均购自 Sigma 和 Acros;三氟乙酸酐由济南万兴达化工有限公司提供; α -羟基- ω -醛基聚乙二醇(HO-PEG-CHO)由太原市荣元科技有限公司提供;透析袋由科昊生物工程有限责任公司提供;其他试剂均由西安试剂厂提供;紫外分光光度计(Mapada 仪器有限公司 UV-1100);冻干机(Vir-Tis SP TechCare);油电二用恒温培养箱、恒温水浴锅、DF-型集热式磁力搅拌器(江苏金坛);核磁共振仪(Avance DMX500, Bruke 公司)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 聚苹果酸的合成^[19,20] (1) 溴代丁二酸的合成 称取 10 g L-天冬氨酸, 42.6 g 溴化钠, 溶于 160 ml 2 M 硫酸水溶液于冰水浴中反应, 1 h 后, 将 6.12 g 亚硝酸钠溶于 20 ml 蒸馏水中, 逐滴加入硫酸水溶液中, 30 min 内滴完。滴加完毕后继续反应 30 min。停止反应后, 将溶液用乙酸乙酯萃取三次, 合并萃液并用无水硫酸镁干燥。抽滤除去无水硫酸镁, 旋转蒸发除去溶剂乙酸乙酯, 得黄色固体。将其溶于乙腈 80℃下重结晶, 完全溶解后冷却析出固体, 得到溴代丁二酸。(2) 溴代丁二酸酐的合成 称取 10 g 溴代丁二酸溶于 20 ml 四氢呋喃中, 完全溶解后, 加入 10 ml 三氟乙酸酐, 反应 90 min。停止反应后, 旋转蒸发除去部分溶剂, 室温冷却析出晶体, 抽滤后得到溴代丁二酸酐。(3) β -苄氧羰基 β -丙内酯的合成 称取 10 g 溴代丁二酸酐溶于 20 ml 四氢呋喃中, 45℃下搅拌至溶解, 将 6.0 g 苯甲醇逐滴加入四氢呋喃中, 1 h 内滴完。反应过夜。停止反应后, 将反应溶液用 20 ml 乙醚洗涤一次, 用 20 ml 蒸馏水洗涤三次, 洗涤完毕后, 使用无水硫酸镁干燥。抽滤除去无水硫酸镁, 将滤液旋转蒸发除去, 得到黄色油状液体。用 2 M 氢氧化钠溶液将其调节至 pH7.5。加入 20 ml 二氯甲烷, 45℃回流搅拌 4 h, 保持 pH7.5。停止反应后, 将溶液倒入分液漏斗中, 收集有机相。并将水相用二氯甲烷萃取一次, 合并有机相。用 5%将有机相洗涤, 然后用蒸馏水洗至中性, 最后使用无水硫酸镁进行干燥。抽滤除去无水硫酸镁,

旋转蒸发除去溶剂二氯甲烷, 得黄色油状液体。湿法装硅胶柱, 洗脱剂为二氯甲烷:石油醚(5:1), 将含有样品的洗脱液进行旋转蒸发, 得到 β -苄氧羰基 β -丙内酯。采用红外光谱进行表征。(4) 聚苹果酸的合成 称取 0.36 g β -苄氧羰基 β -丙内酯加入三颈瓶中, 抽真空约 1 h, 加入 15 μ l 苯甲酸四乙基铵溶液, 抽真空后封管。37℃恒温油浴约 4 天。所得产物溶于 4 ml 丙酮, 加入乙醇 20 ml (乙醇:丙酮=5:1), 沉淀得固体, 真空干燥, 得 0.29 g 白色粉末 β -聚苹果酸苄基酯。称取 β -聚苹果酸苄基酯 0.25 g 溶于 10 ml 二氧六环, 加入钯黑(钯:碳)0.1 g, 导入氢气, 常温搅拌进行氢解。然后抽滤滤除钯黑, 浓缩得到聚合物在乙醚中沉淀, 真空干燥得产物 0.12 g。

1.2.2 聚苹果酸的结构表征 采用红外光谱和核磁共振图谱表征 PMLA。

1.2.3 醛基聚乙二醇-叶酸(CHO-PEG-FA)的制备 称取 198 mg 叶酸和 600 mg α -羟基- ω -醛基聚乙二醇溶于 40 ml 无水 DMSO 中, 将 261 mg EDC·HCl, 36.6 mg DMAP 加入 DMSO, 室温下反应 24 h。反应后的溶液用无水 DMSO 透析一天, 蒸馏水透析两天, 将透析袋内的溶液冷冻干燥。

1.2.4 带有酰肼键的聚苹果酸(PMLA-NH₂)的制备 称取 80 mg PMLA, 88 mg NHS 溶于 20 ml DMF 中, 室温下搅拌 5 min。加入 192 mg EDC·HCl, 冰浴中反应 2 h。2 h 后, 在一小时内逐滴加入 1 ml 5%水合肼溶液, 室温下反应过夜。反应后的溶液用蒸馏水透析两天, 将透析袋内的溶液冷冻干燥。

1.2.5 聚苹果酸-聚乙二醇-叶酸(PMLA-PEG-FA)的制备 称取 6 mg PMLA-NH₂ 和 126 mg CHO-PEG-FA 溶于 20 ml DMF 中, 然后加入 17 mg EDC·HCl, 室温下反应 24 h。反应后的溶液用蒸馏水透析两天, 最后将透析后的溶液冷冻干燥, 得淡黄色固体。

1.2.6 聚苹果酸-聚乙二醇-叶酸(PMLA-PEG-FA)的结构表征 采用红外光谱分析 PMLA 与水合肼的偶联情况。通过 ¹H-NMR 表征 PMLA、CHO-PEG-FA、PMLA-PEG-FA 的结构。

1.2.7 PMLA-PEG-FA 中的叶酸稳定性研究 称取三份 20 mg PMLA-PEG-FA 溶于透析袋内, 分别以 pH 为 5.5, 6.5, 7.4 的 100 ml 缓冲液为释放介质, 恒温箱温度 37℃中搅拌。一定的时间间隔内取出 3 ml, 同时补入相同体积的缓冲液。释放出的叶酸浓度通过紫外分光光度计在波长 280 nm 处测定。

1.2.8 PMLA-PEG-FA 的细胞毒性研究 收集对数期的 SM-CC-7721 肝癌细胞, 调节细胞悬液浓度为 1×10^5 /ml, 在 96 孔板上每孔接种 100 μ l, 加入不同浓度 (1 mg/ml-20 mg/ml) 的 PMLA-PEG-FA, 每种浓度设 3 个复孔并设空白对照组。培养 48 h, 然后每孔加 MTT (5 mg/ml), 继续培养 4 h, 随后加入 150 μ l DMSO, 振荡 10 min 后用酶标仪在 490 nm 处测每孔 OD 值。抑制率(%)=[(空白对照组 OD 值 - 实验组 OD 值)/空白对照组 OD 值] $\times$ 100%。

1.2.9 统计学分析 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 组间比较 t 检验。PMLA-PEG-FA 的体外腙键断裂研究中, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$, 有统计学意义。PMLA-PEG-FA 的细胞毒性研究中, 数据无统计学差异, 但有生物学意义。

2 结果

2.1 聚苹果酸 (PMLA) 与聚苹果酸 - 聚乙二醇 - 叶酸(PMLA-PEG-FA)的制备

本实验成功合成 PMLA 与 PMLA-PEG-FA 纳米共聚物。配体叶酸通过醛基聚乙二醇(CHO-PEG)以胺键与水合肼修饰后的聚苹果酸主链键合。紫外分光光度计测定叶酸的含量为 9.31 %。合成路线如图 2。

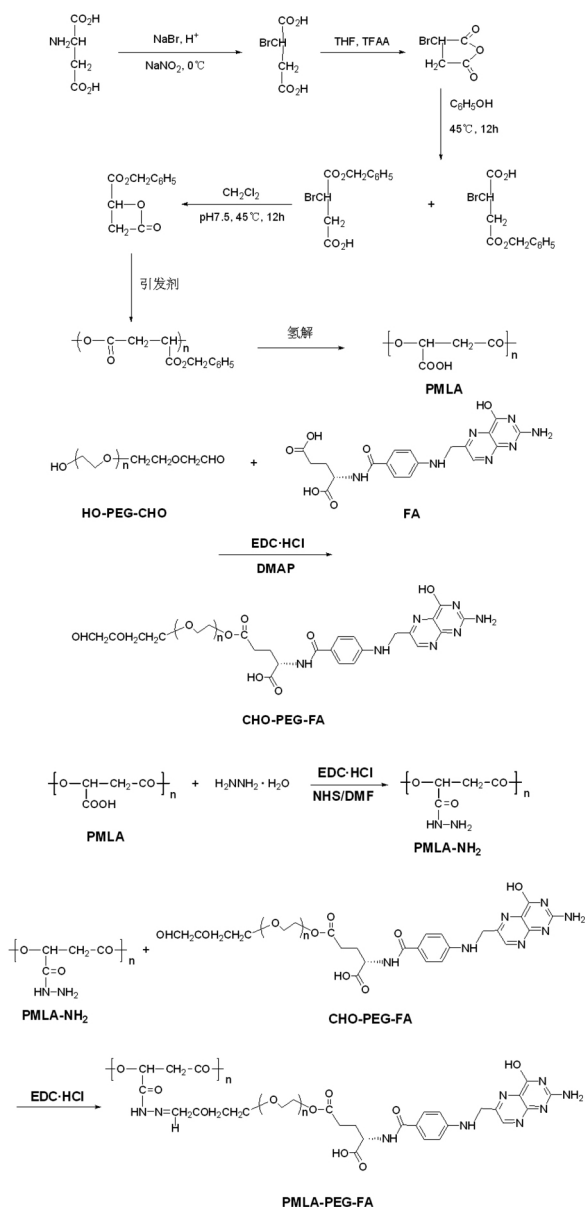


图 2 PMLA 和 PMLA-PEG-FA 的合成路线

Fig.2 Synthesis scheme of PMLA and PMLA-PEG-FA

2.3 PMLA-PEG-FA 中的叶酸稳定性研究

PMLA-PEG-FA 在不同 pH、温度为 37 °C 的叶酸释放曲线如图 4 所示。在 pH5.5、pH6.5 及 pH7.4 的 PBS 缓冲体系中, 6h 时叶酸累积释放率分别为 88.1 %、85.3 %和 41.6 %。表明该共聚物具有良好的响应 pH 值功能。在弱酸环境中, 胺键迅速断裂, 而在 pH7.4(生理 pH)时, 叶酸稳定性较好, 表明该共聚物可用于功能分子的高效利用。

2.2 结构表征

聚苹果酸(PMLA)¹H-NMR 图谱(图 3A)证明聚苹果酸合成成功。图 3C 与图 3B 对比, 图 3C 中在 1612 cm⁻¹ 出现了新的强吸收峰, 为酰胺键中羰基的特征吸收峰, 表明形成了酰胺键, PMLA-NH₂ 合成成功。图 D 与图 E 中的 6.7-9.0ppm 处均出现了叶酸的的特征峰, 证实了目标产物的生成。

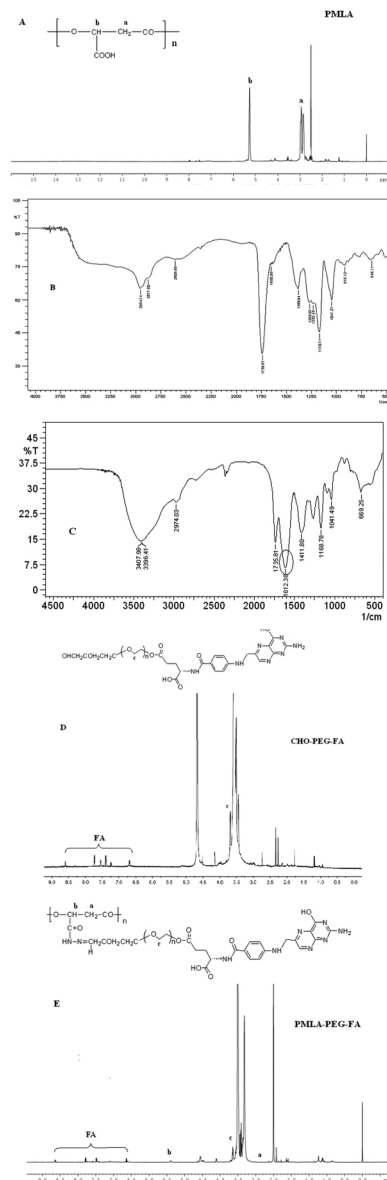


图 3 PMLA(A),CHO-PEG-FA(D),PMLA-PEG-FA(E)的核磁图谱和 PMLA(B), PMLA-NH₂(C)的红外光谱

Fig. 3 ¹H-NMR spectra of PMLA(A),CHO-PEG-FA(D),PMLA-PEG-FA (E) and infrared spectra of PMLA(B),PMLA-NH₂(C)

2.4 PMLA-PEG-FA 的细胞毒性研究

实验中对 PMLA-PEG-FA 的细胞毒性进行了 MTT 实验, 结果表明该共聚物没有明显的细胞毒性(如图 5)。因此证实用 PMLA-PEG-FA 作为抗肿瘤药物载体具有良好的利用价值。

3 讨论

近年来,生物可降解和具有良好生物相容性的高分子聚合

物作为药物载体的研究不断涌现,很多此类聚合物已得到不同程度的应用。例如天然高分子多糖(葡聚糖、壳聚糖等),大量文献报导其可作为优良的抗肿瘤药物载体^[21],聚合物前药中应用较多的聚乳酸、聚乙醇酸、聚谷氨酸等。它们无毒性,具有良好的生物相容性和可降解性,以及无免疫原性。这些具有生物相容性和生物可降解性的高分子材料作为小分子药物的载体可在病灶部位选择性地释放药物,能极大地提高了药物的生物利用率,将靶向分子引入聚合物,还可将药物主动靶向至病变部位。很多研究已证实聚苹果酸具有上述作为药物载体的高分子材料的特点,其在生理条件下的相对高溶解性、高自发降解速率和免疫惰性使它成为优于多糖和多肽类生物高分子的新型药物控释载体材料。此外,聚苹果酸在侧链上具有悬挂羧基,容易与其它官能团反应而制得 PMLA 衍生物,或着引入功能基团或小分子化合物。

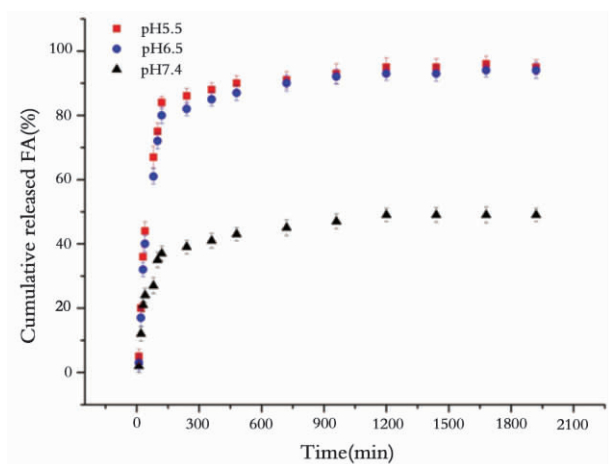


图 4 37℃不同缓冲液中的叶酸释放曲线

Fig.4 Cumulative release profile of FA at different pH value

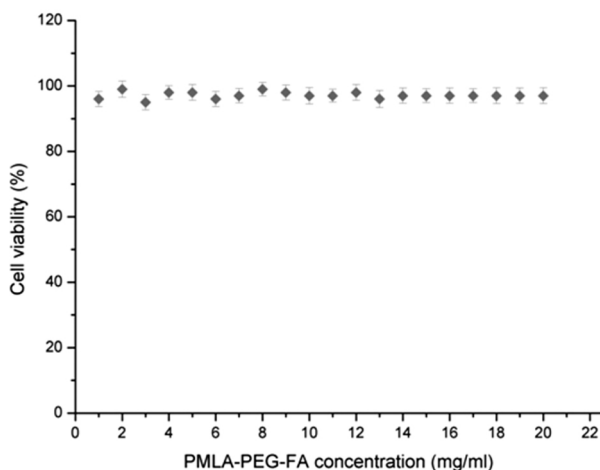


图 5 PMLA-PEG-FA 的细胞毒性

Fig.5 Cell viability after exposure to PMLA-PEG-FA at various concentrations

很多抗肿瘤药物运转体系中引入了靶向分子,具有很好的肿瘤靶向性,但是仍然有相当部分的药物在细胞外释放,导致药物扩散后可能分布到正常组织,降低靶向药物的特异性,导致正常细胞的死亡。因此,药物载体的高效入胞非常关键,在构

建高效低毒的肿瘤靶向给药系统中,我们可以引入一些具有高效入胞的生物学功能分子。

因此本研究中采用聚苹果酸为载体,叶酸通过醛基-聚乙二醇以胺键连接在经过水合肼修饰的聚苹果酸的主链上,胺键因具有很好的 pH 响应特性而作为酸敏部位。我们成功合成的聚苹果酸-聚乙二醇-叶酸纳米共聚物具有肿瘤组织靶向性,可降低药物对正常组织的毒副作用。通过体外酸敏部位解离的试验(纳米共聚物中盐酸的稳定性研究),我们发现此共聚物的胺键作为酸敏连接臂具有很好的 pH 响应特性,在生理 pH 时较少地断裂,稳定性较好,而在酸性环境中断裂得很快。细胞毒性实验的结果表明此共聚物没有明显的毒性,可充分预见其对正常组织无毒副作用以及降解后无蓄积毒性。综上所述,本研究为构建高效低毒的肿瘤靶向给药系统提供了重要的工作基础。

参考文献(References)

- [1] Vert M, Lenz RW. Preparation and properties of poly b-malic acid: a functional polyester of potential biomedical importance [J]. Polym Prepr (Am Chem Soc, Div Polym Chem), 1979, 20:608-611
- [2] Ljubimova JY, Fujita M, Khazenon NM, et al. Nanoconjugate based on polymalic acid for tumor targeting [J]. Chem Biol Interact, 2008, 171(2): 195-203
- [3] Jae H P, Gurusamy S, Kwangmeyung K, et al. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010, 62: 28-41
- [4] Christopher PL, Joseph AR. Folate-targeted chemotherapy [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, 56(8): 1127-1141
- [5] New folated-functionalized biocompatible block copolymer micelles as potential anti-cancer drug delivery systems [J]. Polymer, 2006, 47(9): 2946-2955
- [6] Niesner U, Halin C, Lozzi L, et al. Quantitation of the tumor-targeting properties of antibody fragments conjugated to cell-permeating HIV-1 TAT peptides[J]. Bioconjug Chem, 2002, 13(4):729-736
- [7] Normanno N, Bianco C, Strizzi L, et al. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview [J]. Curr Drug Targets, 2005, 6(3): 243-257
- [8] Maha S, Olga BG, Tamara M. Co-delivery of siRNA and an anticancer drug for treatment of multidrug-resistant Cancer [J]. Nanomedicine, 2008, 3(6): 761-776
- [9] Kim R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy[J]. Cancer, 2005, 103: 1551-1560
- [10] Manabu F, Bong SL, Natalya MK, et al. Brain tumor tandem targeting using a combination of monoclonal antibodies attached to biopoly (β-L-malic acid) [J]. Journal of Controlled Release, 2007, 122: 356-363
- [11] Manabu F, Natalya MK, Alexander VL, et al. Inhibition of laminin-8 in vivo using a novel poly (malic acid)-based carrier reduces glioma angiogenesis[J]. Angiogenesis, 2006, 9: 183-191
- [12] Bong SL, Manabu F, Natalya MK, et al. Polycyfin, a new prototype of a multifunctional nanoconjugate based on poly (β-malic acid) for drug delivery[J]. Bioconjugate Chem., 2006, 17: 317-326
- [13] Torchilin VP. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(4-5):548-558

(下转第 4061 页)

- omes[J]. Clin Oncol, 2010, 28(18):302-303
- [4] Nevin J, Sceters R, Dehaeck K, et al. Cervical carcinoma associated with pregnancy[J]. Obstet Gynecol Surv, 1995, 50(3) : 228-239
- [5] Van der Vange N, Weverling GJ, Ketting BW, et al. The prognosis of cervical cancer associated with pregnancy: a matched cohort study[J]. Obstet Gynecol, 1995, 85:1022-1026
- [6] H.A. Azim Jr., L. Del Mastro, G. Scarfone, et al. Treatment of breast cancer during pregnancy: Regimen selection, pregnancy monitoring and more[J]. The Breast, 2011:1-6
- [7] 蒋荣珍, 黄亚娟, 滕银成, 等. 妊娠合并恶性肿瘤 9 例妊娠结局分析[J]. 中国妇产科临床杂志, 2011, 12(4) 268-271
Jiang Rong-zhen, Huang Ya-juan, Teng Yin-cheng, et al. Pregnancy outcomes analysis of 9 cases of pregnancy with cancer [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2011, 12(4) 268-271
- [8] 吴静. 妊娠合并恶性肿瘤 18 例临床分析 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2004, 20(3) :178-180
Wu Jing. Pregnant women with cancer Analysis of 18 cases [J]. Chinese Journal of Gynecology and Obstetrics, 2004, 20(3):178-80
- [9] 蔡慧华, 王雪峰. 妊娠合并恶性肿瘤 15 例临床分析[J]. 实用妇产科杂志, 2011, 27(6) 468-470
Cai Hui-hua, Wang Xue-feng. Pregnant women with cancer Analysis of 15 cases [J]. Journal of Practical Obstetrics and Gynecology, 2011, 27(6):468-470
- [10] 徐俊. 妊娠合并恶性肿瘤 22 例临床分析 [J]. 医药论坛杂志, 2010, 31(17) 41-43
Xu Jun. Pregnant women with cancer Analysis of 22 cases [J]. Medical Forum, 2010, 31(17):41-43
- [11] YD Chankapa, R Pal, D Tsering. Correlates of cervical cancer screening among underserved women [J]. Indian Journal of Cancer, 2011: 40-46
- [12] Krystyna Serkies, Ewa Wdgrzynowicz, Jacek Jassem. Paclitaxel and cisplatin chemotherapy for ovarian cancer during pregnancy: case report and review of the literature [J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 283 (Suppl 1):S97-S100
- [13] Gil Zeligson MD, Amnon Hadar MD MHA, Michael Koretz MD, et al. Uneventful Pregnancy and delivery after tram Flap reconstruction following Bilateral mastectomies[J]. Case Communications, 2011:381-383
- [14] Pandhi D, Sonthalia S. Human papilloma virus vaccines: Current scenario[J]. Indian J Sex Transm Dis, 2011 Jul, 32(2):75-85
- [15] 徐飏, 俞顺章, 李旭亮, 等. 上海妇女妊娠期激素水平与乳腺癌发病率模式的生态学研究[J]. Tumor(Shanghai), 2001, 21(1) 32-35
Xu Biao, Yu Shun-zhang, Li Xun-liang, et al. Shanghai Women's hormone levels during pregnancy and breast cancer incidence patterns of ecological research[J]. Tumor(Shanghai), 2001, 21(1):32-35
- [16] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 2004 : 586
Cao Ze-yi. Chinese Obstetrics and Gynecology[M]. The Second Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004: 586
- [17] 曹泽毅. 临床诊疗指南·妇产科学分册[M]. 北京. 人民卫生出版社, 2007 240-241
Cao Ze-yi. Clinical Practice Guidelines · Obstetrics and Gynecology Volume [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007: 240-241
- [18] 陈小菊. 妊娠合并恶性肿瘤之临床研究[J]. 现代预防医学, 2011, 38(13):2489-2491
Chen Xiao-ju. Clinical study of pregnant women with cancer[J]. Modern Preventive Medicine, 2011, 38(13):2489-2491

(上接第 4022 页)

- [14] Vives E, Schmidt J, Pèlegri A. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1786(2): 126-138
- [15] Lee ES, Gao Z, Kim D, et al. Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pH specific TAT exposure and multidrug resistance[J]. J Control Release, 2008, 129(3): 228-236
- [16] Zhang ZP, Lee SH, Feng SS. Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery[J]. Biomaterials, 2007, 28: 1889-1899
- [17] Zhang HT, Li F, Fan L, et al. Folate-decorated maleilated pullulan-doxorubicin conjugate for active tumor-targeted drug delivery[J]. Eur. J. Pharm. Sci, 2011, 42: 517-526
- [18] Swati B, Namita S D, Rupa R S, et al. Development of the novel PEG-PE-based for the reversible attachment of specific ligands to liposomes: synthesis and in vitro characterization [J]. Bioconjugate Chem, 2011, 22: 2005-2013
- [19] Sandrine C, Isabelle R, Valérie L, et al. Poly (β-malic acid): obtaining high molecular weights by improvement of the synthesis route [J]. Polymer, 1996, 37(18): 4215-4220
- [20] Philippe G, Michel V, Christian B, et al. Optically active poly (β-malic acid)[J]. Polymer Bulletin. 1985, 14: 187-192
- [21] Li F, Fei L, Haitao Z, et al. Co-delivery of PDTC and doxorubicin by multifunctional micellar nanoparticles to achieve active targeted drug delivery and overcome multidrug resistance [J]. Biomaterials, 2010, 31(21): 5634-5642