doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.04.005

D- 甘露糖修饰黄芩苷阳离子脂质体的制备及其对肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用 *

李武超[1] 张 平[1] 王 元[1] 林茂铨[1] 李范珠[2] 朱志红[2△]

（1 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心 北京 100044；2 浙江中医药大学药学院 浙江 杭州 311400）

摘要 目的：制备一种 D- 甘露糖修饰的黄芩苷阳离子脂质体[Baicalin cationic liposome，BC-Lipo(+)]，并考察其对肺癌 A549 细胞增殖的抑制效果。**方法：**用乙醇注入法制备 BC-Lipo(+)，并考察其药剂学性质；以肺癌 A549 细胞为模型，采用 MTT 法考察其对肿瘤细胞的抑制效果。**结果：**透射电镜下可见 BC-Lipo(+)呈圆形或类圆形，平均粒径(111.3± 2.7)nm，Zeta 电位(9.6± 0.3)mV，包封率 (95.4± 0.8)%；体外释药行为符合 Ritger-Peppas 方程 (lnQ=0.3497lnt - 1.6611，r=0.9924)；A549 细胞的增殖抑制率可达(88.3± 5.7)%。**结论：**处方和制备工艺合理，BC-Lipo(+)包封率较高，粒径分布均匀，带一定的正电荷，具有明显的体外缓释特性，抑制肺癌 A549 细胞增殖效果显著，为深入研究肺靶向 BC 纳米脂质体制剂奠定了基础。

关键词：黄芩苷；阳离子脂质体；体外释放；抗肿瘤活性

中图分类号：R-33；R734.2；R94 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2021)04-625-04

Preparation of D-mannose Modified Baicalin Cationic Liposome and Its Inhibitory Effect on the Proliferation of Lung Cancer A549 Cells*

LI Wu-chao[1], ZHANG Ping[1], WANG Yuan[1], LIN Mao-quan[1], LI Fan-zhu[2], ZHU Zhi-hong[2△]

(1 Center for Food and Drug Inspection of NMPA, Beijing, 100044, China;

2 School of pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang, 311400, China)

ABSTRACT Objective: A D-mannose-modified baicalin cationic liposome [BC-Lipo (+)] was prepared and its inhibitory effect on the proliferation of lung cancer A549 cells was investigated. **Methods:** BC-Lipo (+) was prepared by ethanol injection method, and its properties were investigated; MTT assay was used to investigate the inhibitory effect of BC-Lipo (+) on tumor cells of lung cancer A549 cells. **Results:** The BC-Lipo(+) were round or quasi-round under transmission electron microscopy, the average particle size was (111.3± 2.7) nm, Zeta potential was (9.6± 0.3) mV, entrapment efficiency was (95.4± 0.8)%. The drug release behavior in vitro conformed to the Ritger-Peppas equation (lnQ=0.3497lnt-1.6611, r=0.9924). The proliferation inhibition rate of BC-Lipo (+) against A549 cells was (88.3± 5.7)%. **Conclusions:** The formulation and preparation technology were feasible, and the prepared BC-Lipo (+) had high entrapment efficiency, uniform particle size distribution, positive charge. It had a slow-release characteristic in vitro, and significantly inhibited the proliferation of lung cancer A549 cells in vitro, laying a foundation for further research on lung-targeted BC nanoliposome preparations.

Key words: Baicalin; Cationic liposome; In vitro release; Antitumor activity

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2; R94 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2021)04-625-04

前言

黄芩苷(Baicalin，BC)是黄芩的主要有效成分之一，一定条件下可转化为黄芩素，具有清热、抗炎、退黄以及抗变态反应等多种药理作用。大量研究显示，BC 具有显著的抗肿瘤作用[1-3]，其抗瘤谱广，能有效抑制非小细胞肺癌(A549 细胞 、H1299 细胞)[4]、人肺腺癌 (NCI-H441 细胞、SPC-A1 细胞、LTEP-A2 细胞)[5-7]等的增殖。

BC 的水溶性较差，对光不稳定，且存在体内吸收差、严重的首过效应、生物利用度低以及生物半衰期短等缺点，临床应用受限[8]。脂质体是一种新型药物载体，为脂质双分子层构成的微型囊泡，可用于包封药物，因其类似生物膜结构，在体内可生物降解，无免疫原性。脂质体能提高抗癌药物生物利用度，降低毒副作用，但 BC 普通脂质体静注给药后，药物主要分布于肝、脾组织，但在肺中分布相对较低[9]，导致 BC 抗肺癌效果不佳。

研究报道显示，阳离子脂质体由于表面带正电荷，可与肿瘤新生血管内皮细胞上带负电荷的某些特异性磷脂、过糖基化以及过唾液酸化的膜蛋白等发生静电相互作用，使其更容易被

* 基金项目：国家自然科学基金项目(81873014)

作者简介：李武超(1989-)，男，硕士研究生，主管药师，主要从事药品检查工作，电话：010-68441671，E-mail: liwch@cfdi.org.cn

△ 通讯作者：朱志红，女，博士研究生，讲师，主要从事药物新剂型与新技术研究，E-mail: zzhjanny@163.com

(收稿日期：2020-08-06 接受日期：2020-08-31)

肿瘤细胞摄取,从而产生被动靶向作用[10-12]。

D- 甘露糖(D-mannose)具有 3, 4-OH 的结构,能被肺泡表面活性相关蛋白 A 和 D 识别,在脂质体处方中引入 D- 甘露糖,可实现一定肺部靶向性[13],以改善 BC 抑制肺癌的效果。

本课题拟采用乙醇注入法制备 D- 甘露糖修饰的黄芩苷阳离子脂质体[BC-Lipo(+)],对其体外特性进行表征,考察其对肺癌 A549 细胞增值的影响,为深入研究肺靶向 BC 纳米制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪(LC-20AT,日本岛津);控温磁力搅拌器(HJ-3,常州国宇仪器);超滤管(Amicon Ultra-4,美国 Millipore,MWCO = 30K);电热恒温水浴锅(DK-S22,上海精宏实验设备);恒温震荡仪(HAD-1080,北京恒奥德仪器仪表);激光粒径分析仪(Nano-ZS90,英国 Marlvern);紫外分光光度计(UV-2600A,上海尤尼柯仪器);透射电子显微镜(JEM-1200EX,日本 JEOL)。

1.2 试剂

BC 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110715-201720);BC(纯度 98%,批号:C1828081)、十八胺(Octadecylamine,OC)、D-(+)- 甘露糖(上海阿拉丁生化);大豆卵磷脂(Soybean phospholipids,SPC,上海艾韦特医药,批号:SY-SI-160101);胆固醇(Cholestrol,CHO,日本精化株式会社,批号:B41239);PBS 缓冲液(pH7.4,上海麦克林生化);其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞

人非小细胞肺癌细胞株 A549(浙江省医学科学院实验动物中心)。

1.4 方法

1.4.1 乙醇注入法制备 BC-Lipo(+) 精密量取适量的 SPC、CHO、D- 甘露糖、OC、BC(SPC 浓度为 10 mg·mL^{-1},CHO: SPC=1:4,BC: SPC=1:5,OC 用量为 3%),依次加至适量乙醇中,超声溶解,将该溶液缓慢匀速注入 20 mL 的 PBS 溶液(pH 7.4)中,恒温(50 ℃)磁力搅拌挥尽乙醇,10 min 超声三次,观察脂质体的变化,并依次经微孔滤膜过滤(0.8、0.45 、0.22 μm),即得到 BC-Lipo(+),4 ℃冰箱保存[14]。

除不加 OC 外和 D- 甘露糖外,普通脂质体 BC-Lipo 的制备与 1.4.1 项下方法相同。

1.4.2 BC-Lipo(+)的体外表征 包封率(Entrapment Efficiency, EE):采用 HPLC 法测定 BC 含量。色谱柱为 DiamonsilTM C18(5 μm,150 mm× 4.6 mm);流动相为乙腈:0.2 %磷酸水溶液(35:65);流速 1.0 mL·min^{-1};检测波长 278 nm;柱温 30 ℃;进样量 20 μL。脂质体溶液经超滤离心,收集滤液。滤液取上清液适量与同样未经超滤脂质体样品,甲醇超声破乳,HPLC 测定 BC 含量,记作 W 测,按公式(1)计算 EE。

$$EE\% = (W_{总} - W_{测}) / W_{总} \times 100\% \quad (1)$$

式中:$W_{总}$代表 BC 投料量;$W_{测}$代表 BC-Lipo(+)中的游离药物量。

形态观察:以透射电子显微镜观察并摄片。

粒径和 Zeta 电位:以适量纯水进行稀释,用粒度电位测定仪进行测定。

1.4.3 BC-Lipo(+)的体外释放 采用透析法,以 PBS 缓冲液(pH 7.4)为释放介质。取同样药物浓度的 BC 生理盐水溶液、BC-Lipo、BC-Lipo(+),分别置于透析袋中,密封后分别放入溶出杯中,装有经脱气处理的溶出介质 49 mL,并于 37± 0.5 ℃震荡(80 rpm),按预定时间取样 1 mL,并补加释放介质。经 0.22 μm 滤膜过滤,测定不同时间点的 BC 含量,参照文献方法[15],计算累积释放度。

1.4.4 细胞复苏及培养 肺癌 A549 细胞复苏后,在恒温培养箱(5 % CO_2、37 ℃)中,用 RPMI-1640 培养基进行常规培养。间隔 1 天换液,约 3~4 天待细胞铺满瓶底后即可传代。取传代的第 2~4 代细胞用于该试验[16]。

1.4.5 BC-Lipo(+)的体外细胞毒性试验 选取处于对数生长期的 A549 细胞,加入培养液(含 10%胎牛血清),使细胞浓度为 1× 10^4 mL^{-1},按 100 μL 每孔接种于 96 孔板,置恒温培养箱(5 % CO_2、37 ℃)中培养,待细胞铺满孔底时开始给药。脂质体组每孔各加入 100 μL BC-Lipo(+),空白脂质体组每孔加入 100 μL 相应药物浓度的空白脂质体,BC- 溶液对照组每孔加入 100 μL BC 溶液,每组 6 个复孔。将各组细胞放入恒温培养箱(5 % CO_2、37 ℃)中分别培养 24 h。小心吸去孔内旧培养基后每孔加入 100 μL 新鲜培养液,避光加入 10 μL 现配的 MTT 溶液,在恒温培养箱(5 % CO_2、37 ℃)中培养 4 h,测定 490 nm 处吸光度(OD 值),按公式(2)计算细胞生长抑制率,并按改良寇式法计算半数抑制浓度 IC_{50} 值。

细胞生长抑制率 =(1- 药物平均 OD_0 值 / 对照组平均 OD 值)× 100% (2)

1.4.6 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计学分析,所有实验均独立重复三遍,各参数的定量资料均用平均数± 标准差(mean± SD),组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脂质体的理化性质

脂质体外观结果见图 1,BC-Lipo(+)呈淡蓝色,半透明,乳光明显。透射电镜结果见图 2,BC-Lipo(+)呈圆形或类圆形,表面圆滑,粒径大小分布较均匀,未见黏连、聚集。BC-Lipo(+)平均粒径为(111.3± 2.7)nm,PDI 值为(0.177± 0.199),Zeta 电位为(9.6± 0.3)mV。粒径分布均匀,带正电荷,且体系稳定性良好。BC-Lipo(+)经超滤离心,甲醇破乳后通过 HPLC 定量分析,计算的包封率为(95.4± 0.8)%。释药曲线见图 3,BC 溶液在 12 h 时累积释放度已达(90.0± 3.4)%,而 BC-Lipo、BC-Lipo(+)在 24 h 时累积释放度分别为(62.7± 4.4)%、(53.0± 4.8)%,释放曲线平缓,具有明显的体外缓释作用。

BC-Lipo(+)体外释药数据经零级、一级动力学、Ritger-Peppas、Higuchi 模型拟合,结果见表 1,Ritger-Peppas 模型拟合的相关系数最大。

2.2 体外抗肿瘤作用

以 Blank-lipo 为对照,将 BC 溶液、BC-Lipo(+)按不同浓度(50 μM、100 μM、200 μM)进行分组,培养 24 h 后,测定 OD_{490} 值,得细胞生长抑制率。

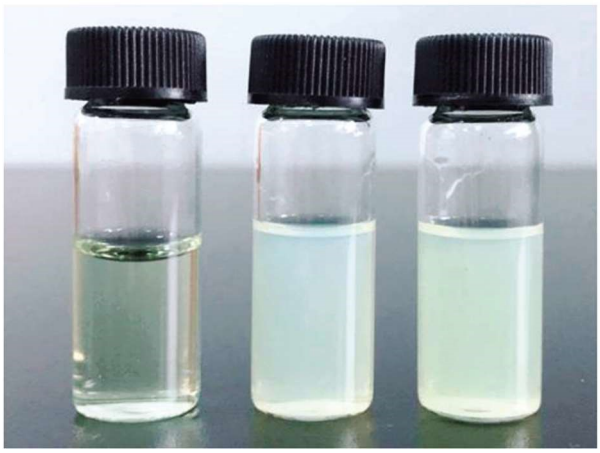

图 1 BC 溶液(左)、BC-Lipo(中)和 BC-Lipo(+)(右)的外观

Fig.1 The appearance of BC solution (left), BC-Lipo (middle) and optimized process of BC-Lipo (+)(right) , respectively

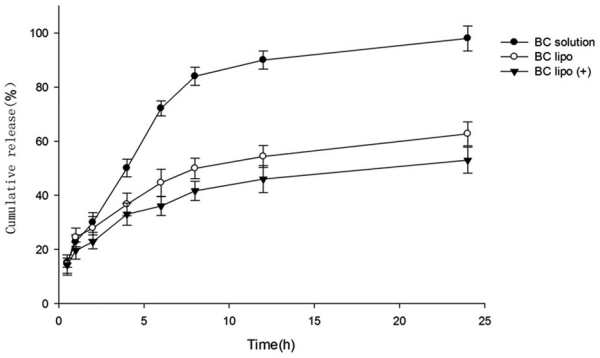

图 3 BC 溶液、BC-Lipo 以及 BC-Lipo(+)的体外释放曲线(n=3)

Fig.3 The in vitro release curves of BC solution, BC-Lipo andBC-Lipo (+), respectively(n=3).

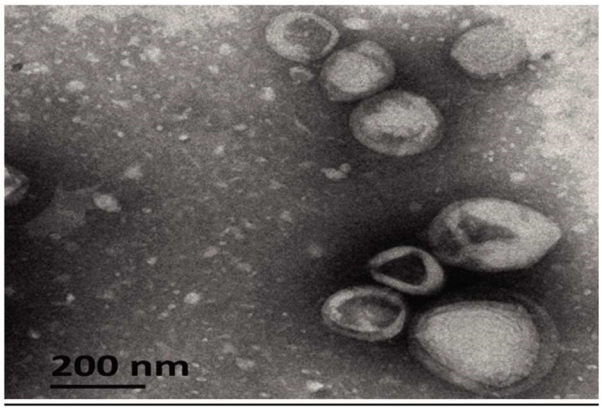

图 2 BC-Lipo(+)的透射电镜照片

Fig.2 The TEM images of BC-Lipo(+)

从图 4 可知,空白脂质体对 A549 细胞增殖基本无抑制效果;同一浓度下,相对于 BC 溶液,BC-Lipo(+) 改善了 A549 细胞的抑制率。在 3 种浓度(50 μM、100 μM、200 μM)时,相对于 BC 溶液,BC-Lipo (+) 对 A549 细胞的抑制率分别由 (23.8± 5.2) 变为 (25.6± 6.2), 由 (39.6± 4.0) 变为 (45.4± 6.0),由 (72.8± 3.7)变为(88.3± 5.7)。

BC 溶液、BC-Lipo(+)对 A549 细胞作用 24 h 后的 IC_{50} 值分别为(114.1± 14.7)、(90.1± 13.4)μg·mL^{-1}。

3 讨论

脂质体制备方法主要有两类, 即主动载药法和被动载药法,前者适于两亲性药物,如弱酸弱碱类药物,pH 值和离子强度在很大程度上可影响其油水分配系数;而后者则包括薄膜分散法、反相蒸发法、微流体法、乙醇注入法以及超声波分散法

表 1 释药回归方程拟合结果(pH 7.4)

Table 1 The fitting results of the regression equation of release (pH 7.4)

Model	Regression equation	R^2
Zero order processes	Q = 0.0155 t + 0.2216	0.7987
First order processes	ln (1 - Q) = -0.0247 t - 0.2462	0.8602
Ritger-Peppas	lnQ = 0.3497 lnt - 1.6611	0.9849
Higuchi	Q = 0.0951 $t^{1/2}$ + 0.1101	0.9480

等,适于脂溶性稍强的药物,包封率较高[17,18]。经前期验证,BC 适用于被动载药的方法,其在热乙醇中溶解性较好,乙醇注入法进行制备,操作方便简单,即将成膜材料与药物溶于乙醇中,再匀速注入处于恒温水浴搅拌条件的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,将乙醇完全挥去,以避免有机溶剂的使用,最后经微孔滤膜过滤后,即得脂质体。具体如上图 2 结果所示,其结构类型为小单层脂质体,呈圆形或类圆形,表面圆滑,粒子之间未见黏连、聚集,粒径大小及分布均匀,且体系稳定性良好。

包封率是评价脂质体质量好坏的重要指标,能区别于普通制剂,以发挥增效减毒作用的关键。有凝胶柱色谱法、超滤离心法、超高速离心法、透析法等方法测定脂质体的包封率[19]。超滤离心是利用溶液中的小分子能够通过离心透过滤膜,而脂质体无法透过滤膜而将脂质体截留,脂质体溶液经超滤离心管超滤离心,收集滤液,将滤液上清液适量与同样未经超滤脂质体样品,以甲醇超声破乳, HPLC 法测定药物含量, 从而通过计算介质中游离药物浓度或脂质体溶液样品总浓度而计算包封率[20,21]。

脂质体的粒径对其在体内的分布至关重要。在正常人体组织中,血管细胞间隙仅为 7 nm,结构完整,脂质体不易自由穿透,而肿瘤组织血管丰富,间隙宽(200-1000 nm),结构完整性差,淋巴回流缺失。被称为实体肿瘤组织的高渗透、长滞留效应,即 EPR 效应[22-24]。脂质体在动物模型上 EPR 效应明显,具有一定的肿瘤组织被动靶向作用,但在人体临床实际应用中 EPR 效应难以达到理想靶向效果[25],通常对脂质体进行表面修饰,以提高其器官靶向性。文献报道 D- 甘露醇修饰的脂质体具有

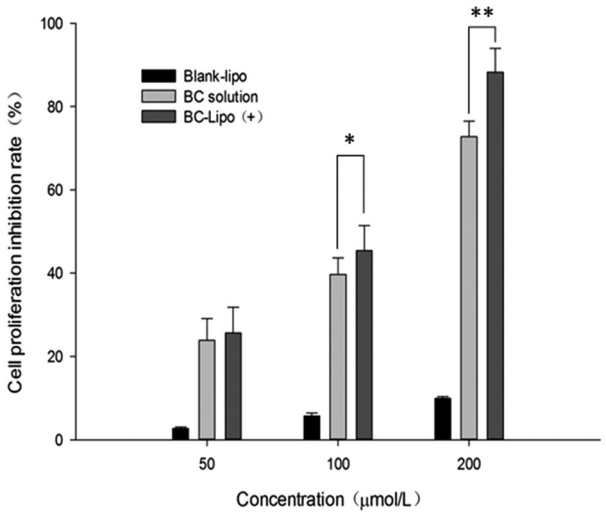

图 4 不同浓度 BC-Lipo(+)、BC 溶液以及空白脂质体的细胞生长抑制率(24 h)

Fig.4 Cell growth inhibition rates of BC-Lipo (+),BC solution and blank-lipoat different concentrations (24 h)

注:结果以 Mean± SD(n=3)表示,* 表示 $P<0.05$; 表示 $P<0.01$**

Note: Results represented as mean± s.d(n=3). *indicates $P<0.05$ and **indicates $P<0.01$.

一定的肺部靶向性[13]。此外脂质体表面的电荷也影响其组织分布,带正电荷的脂质体由于静电作用更易被肺部组织摄取[26,27],因此在脂质体处方中添加了 OC 来改变脂质体表面电荷,使其带正电荷,从而使阳离子脂质体趋向于肺部聚集,改善 BC 的抗肿瘤作用。但 OC 具有较强的刺激性,为了减少其对肺部的刺激,本试验进一步考察了 OC 用量在 0 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %时对脂质体电位的影响,结果显示 OC 用量在 3 %时,制备出 BC-Lipo(+)带合适的电荷,最终确定 OC 用量为 3 %,除此之外,在处方中加入 OC,引入正电荷,可以避免脂质体的聚集,使其保持分散且更稳定。

通过研究 BC-Lipo(+)的释药规律,其释放行为符合 Ritger-Peppas 方程,具有明显的缓释特性。该方程常用于解释可降解体系的药物缓释机理,当 $n\geq 0.89$ 时,释放机理依赖于载体的溶蚀作用;当 $0.45<n<0.89$ 时,释放机理为药物扩散和载体溶蚀双重作用;当 $n\leq 0.45$ 时,释放机理主要为 Fick 扩散[28]。由此可知, BC-Lipo(+)的释药机制为 Fick 扩散。

通过体外肿瘤细胞培养给药, 考察药物的增长抑制效果,是药物筛选的常用方法, 本试验选择肺癌 A549 细胞考察 BC-Lipo(+)对其细胞增殖的抑制效果,分别给予对应不同黄芩苷浓度的药物溶液,以单纯的药物溶液为对照,从对应的 IC50 结果来看,BC-Lipo(+)改善了其抑制效果。

本研究通过乙醇注入法成功制备了 BC-Lipo(+),制备工艺简单,包封率满足现行《中国药典》的规定。此外,BC-Lipo(+)具有明显的体外缓释特性, 且显著抑制 A549 细胞的增殖,为深入研究肺靶向 BC 纳米脂质体制剂奠定了基础。

参 考 文 献(References)

[1] Wang Z, Ma L, Su M, et al. Baicalin induces cellular senescence in human colon cancer cells via upregulation of DEPP and the activation of Ras/Raf/MEK/ERK signaling [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 217-233

[2] Li XL, Zou KL, Gou J, et al. Effect of baicalin-copper on the induction of apoptosis in human hepatoblastoma cancer HepG2 cells [J]. Med Oncol, 2015, 32(3): 72-81

[3] Gao Y, Liu H, Wang H, et al. Baicalin inhibits breast cancer development via inhibiting IκB kinase activation in vitro and in vivo [J]. Int J Oncol, 2018, 53(6): 2727-2736

[4] You J W, Cheng J, Yu B, et al. Baicalin, a Chinese Herbal Medicine, Inhibits the Proliferation and Migration of Human Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) Cells, A549 and H1299, by Activating the SIRT1/AMPK Signaling Pathway [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 2126-2133

[5] Diao X, Yang D F, Chen Y, et al. Baicalin suppresses lung cancer growth by targeting PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase [J]. Biosci Rep, 2019, 39(4): 1-12

[6] 赵华礼, 杨秀娟, 王坤, 等. 黄芩苷体外诱导人肺癌 SPC-A1 细胞凋亡的研究[J]. 中国处方药, 2016, 14(12): 22-23

[7] 韦小白, 董竞成. 黄芩苷对人肺腺癌 LTEP-A2 细胞的抑制作用及机制研究[J]. 世界中医药, 2014, (2): 213-217

[8] 黄婷, 向东, 刘东, 等. 提高黄芩苷生物利用度的研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(4): 82-86

[9] 仵文英, 薛红安, 席枝侠, 等. 黄芩苷脂质体的制备及在小鼠体内的分布[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(5): 282-283

[10] Miller C R, Bondurant B, Mclean S D, et al. Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes [J]. Biochemistry, 1998, 37(37): 12875-12883

[11] He J, Luster T A, Thorpe P E. Radiation-enhanced vascular targeting of human lung cancers in mice with a monoclonal antibody that binds anionic phosphorlipids [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(17): 5211-5218

[12] Thorpe P E. Targeting anionic phospholipids on tumor blood vessels and tumor cells[J]. Thromb Res, 2010, 125(4): S134-S137

[13] 曾俊芬, 黄岭, 鲁建武, 等. 肺靶向羟基喜树碱脂质体的制备及其在小鼠体内的组织分布研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(16): 1374-1379

[14] 董荧荧, 余陈欢, 俞冰, 等. 土贝母皂苷甲长循环脂质体的制备及体外性质考察[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(7): 832-836

[15] Huang X G, Jiang X L, Yang Q Z, et al. Triple-stimuli (pH/thermo/reduction) sensitive copolymers for intracellular drug delivery [J]. J Mater Chem B, 2013, 1(13): 1860-1868

[16] 张健, 王巨, 廖飞, 等. 香鳞毛蕨苷提取物 E 对人肺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响[J].现代生物医学进展, 2019, 19(12): 2262-2266

[17] Sheoran R, Khokra S L, Chawla V, et al. Recent Patents, Formulation Techniques, Classification and Characterization of Liposomes[J]. Recent Pat Nanotech, 2019, 13(1): 17-27

[18] Lou G, Anderluzzi G, Woods S, et al. A novel microfluidic-based approach to formulate size-tuneable large unilamellar cationic liposomes: Formulation, cellular uptake and biodistribution investigations [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2019, 143: 51-60

[19] 马宁辉, 路璐, 丁越, 等. 盐酸阿霉素和知母皂苷 AⅢ共载脂质体的制备及包封率的测定[J]. 中草药, 2019, 50(1): 69-75

[20] 吕凤娇, 赖燕霞, 张远航, 等. 逆相蒸发法制备黄芩苷脂质体工艺的研究[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(3): 219-225

(下转第 658 页)

velopment [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114 (36): E7622-E7631

[14] Herrmann M, Stanić B, Hildebrand M, et al. In vitro simulation of the early proinflammatory phase in fracture healing reveals strong immunomodulatory effects of CD146-positive mesenchymal stromal cells[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2019, 13(8): 1466-1481

[15] Wei Yu-zhen, Zhang Yi-hong, Yang Xin-zhi, et al. Expression of β-catenin and CD146 in mouse endometrial repair model [J]. Journal of Anatomy, 2018, 41(02): 143-146+124

[16] Chaudhari-Kank MS, Zaveri K, Antia V, et al. Comparison of CD9 & CD146 markers in endometrial stromal cells of fertile & infertile females[J]. Indian J Med Res, 2018, 147(6): 552-559

[17] Sylvie Bouvier, Odile Paulmyer-Lacroix, Nicolas Molinari, et al. Soluble CD146, an innovative and non-invasive biomarker of embryo selection for in vitro fertilization[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173724

[18] Yu Yan, Ma Xiu-ping, Gao Hua, et al. Correlation analysis of CD146, VEGF, Survivin protein and missed abortion [J]. Chinese Community Physician, 2016, 32(27): 7-9

[19] Zhang Dan-feng, Lu Jing-yuan, Wu Ying-jie, et al. The relationship between the expression of HGF and its receptor and placental angiogenesis[J]. Heilongjiang Medical Science, 2007, 30(3): 51-52

[20] Chuan Xiang, Junxia Chen, Panfeng Fu. HGF/Met Signaling in Cancer Invasion: The Impact on Cytoskeleton Remodeling [J]. Cancers (Basel), 2017, 9(5): 44

[21] Haiyu Wang, Benchen Rao, Jiamin Lou, et al. The Function of the HGF/c-Met Axis in Hepatocellular Carcinoma[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 55

[22] Rachel N. Frisch, Kevin M. Curtis, Kristina K. Aenlle, et al. Hepatocyte Growth Factor and Alternative Splice Variants - Expression, Regulation and Implications in Osteogenesis and Bone Health and Repair[J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20(9): 1087-1098

[23] Lu Shu-juan. Clinical analysis of 52 cases of HGF expression in endometrial carcinoma and its relationship with angiogenesis [J]. Chinese Medical Guide, 2017, 15(11): 144-145

[24] Zheng Xue-min, Zhu Shi-chao, Yu Xiao-hua, et al. Research progress of hepatocyte growth factor and its receptor in new drug discovery[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2017, 26(20): 2444-2449

[25] Pavel I. Makarevich, Konstantin V. Dergilev, Zoya I. Tsokolaeva, et al. Angiogenic and pleiotropic effects of VEGF165 and HGF combined gene therapy in a rat model of myocardial infarction [J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0197566

[26] Guo Chun-yan, Chong Xiao-xia. Changes of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in aqueous humor of iris neovascularization rats [J]. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 2013, 7(18): 8312-8316

[27] Zhuang Xiao-ping, Dong Xiao-feng, Lin Qiong-qiong. Expression and clinical significance of RON and HGF in endometrial cancer[J]. Modern Practical Medicine, 2017, 29(7): 911-912 + 980-982

[28] Piyush Chaudhary, Gosipatala Sunil Babu, Ranbir Chander Sobti, et al. HGF regulate HTR-8/SVneo trophoblastic cells migration/invasion under hypoxic conditions through increased HIF-1α expression via MAPK and PI3K pathways [J]. J Cell Commun Signal, 2019, 13: 503-521

[29] Agostinis C, Masat E, Bossi F, et al. Transcriptomics and Immunological Analyses Reveal a Pro-Angiogenic and Anti-Inflammatory Phenotype for Decidual Endothelial Cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 31; 20(7)

[30] Kannampuzha-Francis J, Tribulo P, Hansen PJ. Actions of activin A, connective tissue growth factor, hepatocyte growth factor and teratocarcinoma-derived growth factor 1 on the development of the bovine preimplantation embryo[J]. Reprod Fertil Dev, 2017, 29(7): 1329-1339

[31] Shi Chun-yan. The relationship between hepatocyte growth factor and transforming growth factor-β1 in villi and missed abortion [J]. Chinese Journal of Sex Science, 2019, 28(2): 99-101

[32] Li Hui, Huang Ming-li, Sun Xin, et al. Advances in research on mechanism and influencing factors of uterine decidual spiral artery remodeling during pregnancy [J]. Chinese Journal of Reproductive Health, 2017, 28(6): 591-593

[33] Fu Yv, Huang Ming-li, Yuan Jing, et al. Research progress on the main causes and treatment of embryo cessation in early pregnancy[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine of Women and Children (Electronic Version), 2015, 11(2): 110-113

[34] Ilary Ruscito, Dan Cacsire Castillo-Tong, Ignace Vergote, et al. Characterisation of tumour microvessel density during progression of high-grade serous ovarian cancer: clinico-pathological impact (an OCTIPS Consortium study) [J]. Br J Cancer, 2018, 119(3): 330-338

(上接第 628 页)

[21] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 134

[22] Golombek S K, Jan-Niklas M, Benjamin T, et al. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2018, 130: 17-38

[23] Ling L, Du Y, Ismail M, et al. Self-assembled liposomes of dual paclitaxel-phospholipid prodrug for anticancer therapy [J]. Int J Pharm, 2017, 526(1-2): 11-22

[24] Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect[J]. Adv Drug Deliver Rev, 2011, 63(3): 131-135

[25] Danhier, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? [J]. J Control Release, 2016, 244: 108-121

[26] 陈伟光, 刘源岗, 王士斌, 等. 阳离子脂质体共载基因与化疗药物用于癌症治疗的研究进展[J].药学学报, 2012, 47(8): 986-992

[27] Paolino D, Cosco D, Cilurzo F, et al. Improved in vitroand in vivo collagen biosynthesis by asiaticoside-loaded ultradeformable vesicles [J]. J Control Release, 2012, 162(1): 143-151

[28] 叶玉杰, 任德全, 刘嵩, 等. Origin 软件拟合溶蚀型载体药物传输系统的 Ritger-Peppas 方程研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(4): 62-63