

长春碱纳米粒的细胞毒性和急性毒性研究

刘玉梅^{1,2}, 欧阳五庆¹, 张自强², 杨雪峰³, 马淑燕¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003;

3 河南科技学院 动物科技学院, 河南 新乡 453003)

[摘要] **【目的】**探讨长春碱聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(VLB-PBCA-NP)对正常细胞的毒性及其急性毒性。**【方法】**采用 MTT 法并结合形态学观察,比较了 VLB-PBCA-NP 和 VLB 原料药对原代大鼠星形胶质细胞和小鼠成纤维细胞 L929 的毒性;用相同剂量的 VLB-PBCA-NP 和 VLB 原料药溶液对小鼠进行尾静脉注射,每日观察小鼠死亡情况,并计算半数致死量(LD₅₀)。**【结果】**在质量浓度为 0.5~50 ng/mL 时,VLB-PBCA-NP 和 VLB 原料药对星形胶质细胞增殖抑制率的影响无显著性差异,当质量浓度达到 500 和 5 000 ng/mL 时,VLB-PBCA-NP 对大鼠星形胶质细胞的毒性显著低于 VLB 原料药($P<0.05$)。5 000 ng/mL 的 VLB-PBCA-NP 对小鼠成纤维细胞 L929 的毒性为 3 级,极显著降低了 VLB 原料药的毒性($P<0.01$)。VLB-PBCA-NP 和 VLB 原料药的 LD₅₀ 分别为 26.38 和 22.7 mg/kg,前者较后者提高了 16.21%。**【结论】**VLB-PBCA-NP 对小鼠的急性毒性和对非肿瘤细胞的毒性均显著低于 VLB 原料药。

[关键词] 长春碱;纳米粒;L929 细胞;星形胶质细胞;半数致死量

[中图分类号] R944.9;R965.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)10-0031-06

Cytotoxicity and acute toxicity study on vinblastine (VLB) nanoparticles

LIU Yu-mei^{1,2}, OUYANG Wu-qing¹, ZHANG Zi-qiang², YANG Xue-feng³, MA Shu-yan¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China;

3 College of Animal Science, Henan institute of science and technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: **【Objective】**The aim of this study was to investigate toxicity of VLB poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles (PBCA-NP). **【Method】**Difference between VLB-PBCA-NP and crude VLB on the growth of L929 and rat astrocyte was measured by MTT assay and morphology method. In addition, after the same dose of VLB-PBCA-NP and crude VLB solution were injected into mice tail vein, 50% lethal dose of (LD₅₀) was counted. **【Results】**The results indicated that there was no significant difference on the effect of rat astrocyte growth between 0.5—50 ng/mL VLB-PBCA-NP and crude VLB solution, but 500 and 5 000 ng/mL VLB-PBCA-NP significantly degraded cytotoxicity ($P<0.05$). 5 000 ng/mL VLB-PBCA-NP belonged to toxicity grade 3 on L929 fibroblasts growth, and very significantly degraded crude VLB toxicity. The LD₅₀ of VLB-PBCA-NP and crude VLB solution was respectively 26.38 and 22.7 mg/kg. The LD₅₀ of VLB-PBCA-NP increased by 16.21% compared with crude VLB solution. **【Conclusion】**VLB-PBCA-NP degraded acute toxicity and nontumorous cells toxicity of crude VLB.

Key words: vinblastine (VLB); nanoparticle; L929 cell; astrocyte; LD₅₀

* [收稿日期] 2009-01-13

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAD04A11)

[作者简介] 刘玉梅(1979—),女,内蒙古通辽人,讲师,在读博士,主要从事药物研发及细胞生理研究。E-mail:lymzq@126.com

[通信作者] 欧阳五庆(1960—),男,陕西凤翔人,教授,博士生导师,主要从事纳米药物与纳米生物学研究。

E-mail:oywq506@sina.com

长春碱(Vinblastine, VLB)是从夹竹桃科植物长春花中提取的一种双氢吲哚类生物碱,能与 β -微管蛋白结合,阻断纺锤体的形成,使有丝分裂停止,从而将细胞阻滞于分裂间期^[1]。VLB对何杰金病及非小细胞性肺癌、恶性淋巴瘤等有显著疗效,其硫酸盐已广泛用于临床,是主要的抗肿瘤药物之一^[2]。然而,像其他细胞毒药物一样,VLB缺乏对肿瘤组织的选择性,半衰期短且易使抗肿瘤细胞产生多药耐药性,这严重限制了其长期反复应用于肿瘤的治疗^[3-4]。研究表明,抗肿瘤药物的纳米粒(Nanoparticles, NPS)制剂可延长药物的半衰期,提高对肿瘤组织的靶向性,降低毒副作用,逆转肿瘤细胞的多药耐药性^[5]。西北农林科技大学动物生理学实验室研制了VLB聚氰基丙烯酸酯正丁酯纳米粒(PBCA-NP),其粒径分布较窄,包封率和载药量较高,并能够提高对胶质瘤细胞BT325的毒性^[6],然而尚未见有关其对非肿瘤细胞体外毒性及对动物体内毒性的研究报道。为此,本研究考察了VLB-PBCA-NP对原代培养大鼠星形胶质细胞和小鼠成纤维细胞L929的体外细胞毒性以及对小鼠的体内急性毒性,以期为VLB-PBCA-NP的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物和细胞株 小鼠成纤维细胞L929及1日龄大鼠和100只昆明种小白鼠(体质量 (20 ± 2) g,雌雄各半),均购自第四军医大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM(高糖)培养基和DMEM/F12培养基,购自GIBCO公司;胎牛血清,购自杭州四季青生物工程材料有限公司;胰蛋白酶试剂盒,购自碧云天生物技术研究所;MTT,购自Sigma公司。

主要仪器及设备:CKX41倒置显微镜,日本Olympus公司生产;MCO-15AC CO₂培养箱,日本Sanyo公司生产;Model 550酶标仪,BIO-RAD公司生产。

1.2 大鼠星形胶质细胞的原代培养

参考文献[7]的方法并略加改动。在无菌条件下剪下1日龄大鼠脑组织,用眼科弯镊轻轻撕掉脑膜和血管后,从大脑纵裂处分离大脑皮质。剪碎,吹打分散细胞,在37℃水浴箱中用质量浓度2.5 g/L的胰蛋白酶消化30 min。然后加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,轻轻吹打至

胰酶与培养基混合均匀,1 000 r/min离心5 min,弃上清;重新加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,轻轻吹打至细胞团块消散,制成细胞悬液,然后接种于75 cm²的细胞培养瓶中,置37℃、体积分数5% CO₂的细胞培养箱内培养。每3 d更换培养液1次,至第9天时,将培养瓶置于恒温摇床内以260 r/min振摇过夜,以除去小胶质细胞和少突胶质细胞。

1.3 VLB-PBCA-NP对大鼠星形胶质细胞生长的影响

将纯化后的星形胶质细胞消化、离心后,用完全培养液调整细胞浓度为 1×10^5 mL⁻¹,然后接种于96孔培养板(每孔200 μ L),当各组细胞生长至接近于亚融合状态时,进行相应药物处理。试验设共3组处理,I组细胞用含不同质量浓度(0.5, 5, 50, 500, 5 000 ng/mL)VLB原料药溶液的培养基进行培养;II组细胞用含与I组相同质量浓度的VLB-PBCA-NP培养基进行培养;III组为空白对照组,细胞用质量浓度为5 000 ng/mL VLB-PBCA-NP稀释相同倍数的空白NPS培养基进行培养,每组设3个复孔。各组细胞培养48 h后用倒置显微镜观察细胞的生长状态并拍照,然后更换为无血清培养基,每孔加新配制的5 mg/mL MTT液20 μ L,继续培养4 h后,弃去孔中上清液,每孔加入DMSO 150 μ L溶解甲臞沉淀,用微型超声振荡器震荡摇匀10 min,使紫色结晶充分溶解,在酶标仪上测定490 nm波长下的吸光值。根据测定的吸光值(A)按下式计算细胞生长抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率}/\% = (A_{\text{正常组}} - A_{\text{试验组}}) / A_{\text{正常组}} \times 100\%。$$

1.4 VLB-PBCA-NP对小鼠成纤维细胞L929生长的影响

参照医疗器械生物学评价国家标准GB/T16886.5—1997《医疗器械生物学评价》第5部分,“细胞毒性实验:体外法”及MTT试验方法^[8],将处于对数生长期的小鼠成纤维细胞L929用质量浓度为2.5 g/L的胰蛋白酶进行消化,制成终浓度为 5×10^7 L⁻¹的细胞悬液,接种于96孔培养板中,每孔100 μ L。待细胞生长至亚融合状态时进行试验。试验分为5组,即正常对照组(加100 μ L完全培养液)、VLB原料药组(加100 μ L 5 000 ng/mL的VLB培养液)、VLB-PBCA-NP组(加100 μ L 5 000 ng/mL VLB-PBCA-NP培养液)、空白NPS组(加100 μ L与5 000 ng/mL VLB-PBCA-NP稀释相同倍数的空白NPS培养液)和阳性对照组(加100 μ L

二甲基亚砜),每组设 3 个复孔。于 37℃、体积分数 5% CO₂ 环境下培养 48 h 后终止培养,在倒置显微镜下观察细胞生长状态并拍照,然后每孔加新配制的 5 mg/mL MTT 液 20 μL,继续培养 4 h 后,弃去孔中上清液,每孔加入二甲基亚砜 150 μL 溶解甲磺沉淀,用微型超声振荡器震荡摇匀 10 min,使紫色

结晶充分溶解,在酶标仪上于 490 nm 波长下测定吸光值,根据测定的吸光值按下式计算相对增殖度(RGR),并按表 1 的毒性分级标准对试验结果进行评估。

$$RGR/\% = A_{\text{试验组}} / A_{\text{正常组}} \times 100\%$$

表 1 毒性分级标准
Table 1 Fractionation of toxicity

相对增殖度/% RGR	毒性分级 Toxicity classification	相对增殖度/% RGR	毒性分级 Toxicity classification
≥100	0	25~49	3
75~99	1	1~24	4
50~74	2	0	5

1.5 小鼠急性毒性试验

取健康昆明种小白鼠 50 只,随机均分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半,分别以 9.8,14,20,28 和 40 mg/kg 的剂量尾静脉注射 VLB 原料药溶液。另取健康小白鼠 50 只,同样按上述方法分组,以 9.8,14,20,28 和 40 mg/kg 的剂量尾静脉注射 VLB-PBCA-NP 溶液。给药结束后连续观察 14 d,每天记录小鼠的死亡情况。

1.6 数据处理

试验数据使用医学统计软件 SPSS13.0 进行方差分析,试验结果以“平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)”表示。

2 结果与分析

2.1 VLB-PBCA-NP 对原代大鼠星形胶质细胞生长的影响

2.1.1 增殖抑制率 空白 NPS 组原代大鼠星形胶质细胞的增殖抑制率(1.59%)与正常对照组相比无显著差异。由表 2 可知,在质量浓度为 0.5~50 ng/mL 时,VLB-PBCA-NP 与 VLB 原料药对原代培养大鼠星形胶质细胞增殖抑制率的影响无显著差异;当质量浓度为 500 和 5 000 ng/mL 时,VLB 原料药对大鼠星形胶质细胞的增殖抑制率均显著高于 VLB-PBCA-NP。

表 2 VLB-PBCA-NP 和 VLB 原料药对大鼠星形胶质细胞增殖抑制率的影响
Table 2 Inhibition effect of VLB-PBCA-NP and crude VLB on the rat astrocyte rate

组别 Group	细胞增殖抑制率/% Cell growth inhibition rate				
	0.5 ng/mL	5 ng/mL	50 ng/mL	500 ng/mL	5 000 ng/mL
I	14.27±1.12	27.32±1.29	30.65±1.51	47.36±5.07 a	51.83±4.36 a
II	12.24±0.90	22.64±2.57	27.58±1.98	35.74±1.72 b	42.27±3.75 b

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note:Date in the same row with different small letters indicate significant difference ($P<0.05$).

2.1.2 细胞形态 VLB-PBCA-NP 及 VLB 原料药对原代大鼠星形胶质细胞生长的影响如图 1 所示。

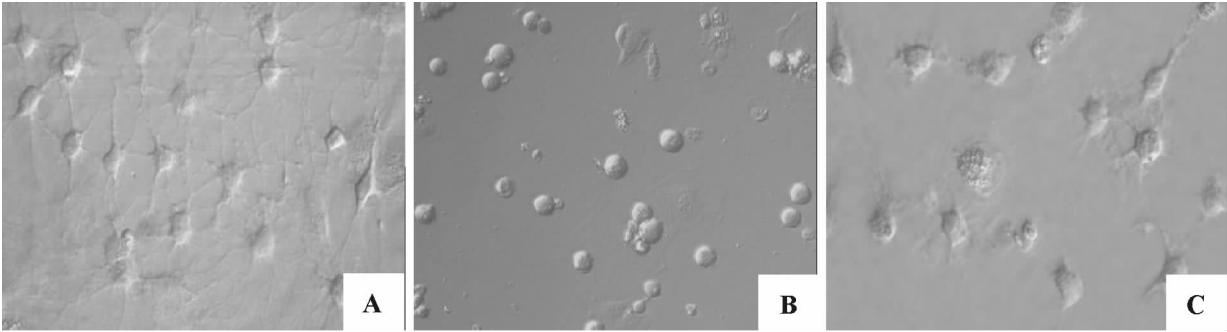


图 1 VLB-PBCA-NP 及 VLB 原料药对原代大鼠星形胶质细胞形态的影响(×200)
A. 正常对照组;B. 5 000 ng/mL VLB 原料药组;C. 5 000 ng/mL VLB-PBCA-NP 组

Fig. 1 Effect of VLB-PBCA-NP and curde VLB on morphological changes of primary rat astrocyte(×200)
A. Normal control group; B. 5 000 ng/mL crude VLB group; C. 5 000 ng/mL VLB-PBCA-NP group

由图 1 可见,正常对照组大鼠的星形胶质细胞呈扁平多边形,核形态饱满,折光率高,活力旺盛,周围具有放射状的细长突起,呈明显的星形(图 1-A);5 000 ng/mL 的 VLB 原料药组细胞大量突起消失,皱缩,细胞结构不完整,多数细胞变圆呈典型的凋亡形态(图 1-B);5 000 ng/mL VLB-PBCA-NP 组的大部分细胞突起消失,细胞之间的突触联系减少,但胞体形态变化不明显,个别细胞周围仍有短小的突起

表 3 VLB-PBCA-NP 对小鼠成纤维细胞 L929 相对增殖度的影响

Table 3 Effect of VLB-PBCA-NP on relative growth rate of L929 cells

组别 Group	相对增殖度/% RGR	毒性级别 Toxicity classification	组别 Group	相对增殖度/% RGR	毒性级别 Toxicity classification
正常对照组 Normal control group	100±1.43 Aa	0	VLB-PBCA-NP 组 VLB-PBCA-NP group	30.07±1.44 Bb	3
空白 NPS 组 Blank NPS group	97.74±0.43 Aa	1	阳性对照组 Positive control group	17.50±1.02 Cd	4
VLB 原料药组 Crude VLB group	20.45±0.72 Cc	4			

注:同列数据后标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Values followed by different capital letters are polari-significantly different ($P<0.01$) and values followed by different small letters are significantly different ($P<0.05$).

结合表 1 的毒性分级可知,空白 NPS 组与正常对照组无显著差异,属于 1 级毒性,对细胞生长无明显影响;VLB 原料药和阳性对照组的细胞增殖度较正常对照组显著降低,属于 4 级毒性;VLB-PBCA-NP 组的细胞毒性属于 3 级,对细胞的生长有一定

存在(图 1-C)。
2.2 VLB-PBCA-NP 对小鼠成纤维细胞 L929 生长的影响
2.2.1 各试验组细胞的毒性分级 由表 3 可知,VLB 原料药组与 VLB-PBCA-NP 组小鼠成纤维细胞 L929 的相对增殖度(RGR)分别为 20.45%和 30.07%,较正常对照组极显著降低($P<0.01$),但显著高于阳性对照组($P<0.05$)。

影响。
2.2.2 VLB-PBCA-NP 对小鼠成纤维细胞 L929 形态的影响 VLB-PBCA-NP 及 VLB 原料药对小鼠成纤维细胞 L929 形态的影响如图 2 所示。

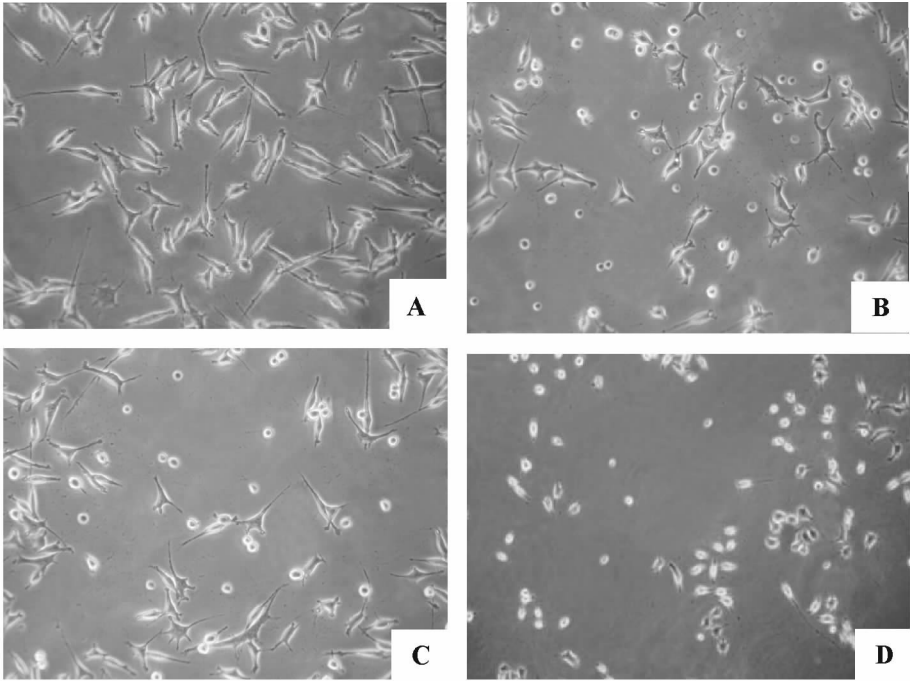


图 2 VLB-PBCA-NP 及 VLB 原料药对小鼠成纤维细胞 L929 形态的影响(×200)

A. 正常对照组;B. 5 000 ng/mL VLB 原料药组;C. 5 000 ng/mL VLB-PBCA-NP 组;D. 阳性对照组

Fig. 2 Effect of VLB-PBCA-NP and crude VLB on morphological changes of L929 cells(×200)

A. Normal control group;B. 5 000 ng/mL crude VLB group;C. 5 000 ng/mL VLB-PBCA-NP group;D. Positive control group

由图 2 可以看出,正常组的小鼠成纤维细胞 L929 形态饱满,呈典型的梭型,折光性强,形态完整,增殖力旺盛(图 2-A);VLB 原料药组(图 2-B)和 VLB-PBCA-NP 组(图 2-C)部分细胞漂浮于培养液中,细胞数量减少,折光性较差,形态不够饱满,皱缩变圆,但仍有部分细胞保持原有形态。与 VLB 原料药组相比,VLB-PBCA-NP 组皱缩变圆的细胞相对较少。阳性对照组细胞数量减少,部分细胞漂浮于培养液中,绝大部分细胞皱缩变圆,凋亡细胞增多,几乎未见保持原有形态的细胞(图 2-D)。

表 4 VLB-PBCA-NP 及 VLB 原料药的急性毒性试验结果

Tab 4 Results of acute toxicity test on the VLB-PBCA-NP and crude VLB

药物 Drug	组别 Group	剂量/(mg·kg ⁻¹) Dose	动物数 Amount of mice	死亡数 Number death
VLB	1	9.8	10	0
	2	14	10	2
	3	20	10	3
	4	28	10	6
	5	40	10	10
VLB-PBCA-NP	1	9.8	10	0
	2	14	10	1
	3	20	10	2
	4	28	10	5
	5	40	10	9

3 讨 论

目前,在开发新的抗癌药物的同时,对原有药物进行剂型改变,以提高其疗效并降低毒副作用,已成为当今药物研发的一个趋势。纳米微粒因具有良好的缓释性、靶向性,以及可降低药物的毒副作用、增加治疗靶器官的疗效而倍受关注。VLB-PBCA-NP 选用 PBCA 为载体,其降解产物为水溶性的聚氰基丙烯酸,可随尿液直接排出,对人体组织基本无毒性^[9]。此外,有研究证实,在一定质量浓度范围(≤28.56 μg/mL)内,PBCA-NP 对人正常肝细胞株 L-02 呈现出较高的相对增殖率,其细胞毒性为 1 级,即无细胞毒性^[10]。VLB 具有严重的毒副作用,故在临床上的应用受到一定限制,因此本研究将其包裹于 PBCA-NP 载体中,以期能提高其抑瘤效果并降低其毒副作用。

体外细胞培养检测生物材料的毒性,是一类在离体状态下模拟生物体生长环境,检测载体材料接触机体组织后生物学反应的体外试验方法,具有快速、敏捷、经济、试验周期短等优点,是生物安全性检测的首选项目。小鼠成纤维细胞 L929 具有传代稳定、繁殖迅速的优点,常被用作毒性检测的标准细

2.3 VLB-PBCA-NP 对小鼠的急性毒性

采用 Bliss 法,通过软件对表 4 的小鼠死亡数进行统计,可知 VLB 原料药组的 LD₅₀ 为 22.7 mg/kg,95%的可信限为 18.82~27.76 mg/kg;VLB-PBCA-NP 组的 LD₅₀ 为 26.38 mg/kg,95%的可信限为 21.87~33.25 mg/kg。与 VLB 原料药组相比,VLB-PBCA-NP 组 LD₅₀ 提高了 16.21%。由此可推断,采用 NPS 对 VLB 进行包裹后,可降低其对小鼠的全身毒性。

胞^[11],因此本研究也选择小鼠成纤维细胞 L929 作为体外细胞毒性试验的靶细胞之一。此外,以往研究证实,VLB 具有明显的神经毒性,这与神经突触内微管不能维持正常功能有关^[12]。星形胶质细胞是脑组织中数量最多的细胞类型,其功能正常与否直接关系到脑组织的机能状态,因此本研究将体外培养的大鼠脑组织星形胶质细胞作为考察 VLB-PBCA-NP 细胞毒性的另一个靶细胞。由 MTT 试验结果并结合细胞形态分析可知,5 000 ng/mL 的 VLB-PBCA-NP 降低了 VLB 原料药对小鼠成纤维细胞 L929 和大鼠脑组织星形胶质细胞的毒性。而在前期工作中,已经证实 VLB-PBCA-NP 对神经胶质瘤细胞 BT325 的毒性作用较 VLB 原料药更强^[6]。其原因可能在于,VLB 是耐药蛋白的作用底物之一,易使肿瘤细胞产生多药耐药性,致使肿瘤细胞内的药物浓度过低而难以维持药效^[13];神经胶质瘤细胞 BT325 膜上的耐药糖蛋白(P-gp)的表达量很高^[14],VLB-PBCA-NP 可能通过躲避 P-pg 的识别而提高肿瘤细胞内的药物浓度,但小鼠成纤维细胞 L929 和星形胶质细胞膜上的 P-gp 表达水平很低,无载体包裹的 VLB 也不会产生耐药现象。此外,VLB-PBCA-NP 进入细胞后从载体内缓慢释放,

不会立即在 L929 成纤维细胞和星形胶质细胞内形成较高的药物浓度,而大剂量的 VLB 原料药进入细胞后很容易引起细胞毒性。

急性毒性试验是基础毒理研究的主要内容之一,所获得的信息对长期毒性试验剂量的设计和某些药物 I 期临床试验起始剂量的选择具有重要参考价值,而 LD₅₀ 是反应急性毒性大小的一个重要指标。本研究发现,VLB-PBCA-NP 对小鼠的毒性小于 VLB 原料药组,其原因可能是 PBCA-NP 缓慢降解促使 VLB 从载体内缓慢释放,避免了一次性大剂量给药而对机体造成的急性损害。

综合分析细胞毒性试验和小鼠急性毒性试验结果表明,VLB-PBCA-NP 对机体的毒副作用小于 VLB 原料药,但有关其详细作用机理还有待于进一步探讨。

[参考文献]

[1] Checchi P M, Nettles J H, Zhou J, et al. Microtubule-interacting drugs for cancer treatment [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2003, 24(7): 361-365.

[2] 李晓蕾, 任其龙, 杨亦文, 等. 抗肿瘤药长春碱的提取纯化与分析方法研究概况 [J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(4): 247-250.

Li X L, Ren Q L, Yang Y W, et al. Outline of extraction purification and analysis of antitumor drug vinblastine [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2004, 35(4): 247-250. (in Chinese)

[3] 刘贤铭. 抗肿瘤药物不良反应及其防治 [J]. 中国药事, 2005, 19(10): 636-638.

Liu X M. Antitumor drug adverse reaction and prevention and cure [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2005, 19(10): 636-638. (in Chinese)

[4] David R F, Malkhandi P J, Russell M A. Allosteric regulation of [³H] vinblastine binding to p-glycoprotein of MCF-7 mdr cells by dextriguldipine [J]. Biochemical Pharmacology, 1995, 49(12): 1851-1861.

[5] Moghimi S M, Hunter A C, Murray J C. Nanomedicine: current status and future prospects [J]. The FASEB Journal, 2005, 19: 311-330.

[6] 刘玉梅, 欧阳五庆, 马淑燕, 等. 长春碱纳米粒的制备及其抗肿瘤活性 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2008, 26(3): 228-232.

Liu Y M, Ouyang W Q, Ma S Y, et al. Preparation of vinblastine nanoparticles and its anti-tumor effect [J]. Journal of

Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science, 2008, 26(3): 228-232. (in Chinese)

[7] Zaheer A, Yang B, Cao X, et al. Decreased copper-zinc superoxide dismutase activity and increased resistance to oxidative stress in glia maturation factor-null astrocytes [J]. Neurochem Res, 2004, 29: 1473-80.

[8] 杜益群. AS₂O₃/Fe₃O₄ 复合纳米粒的制备与生物相容性评价及其热化治疗宫颈癌的研究 [D]. 南京: 东南大学, 2006.

Du Y Q. Research of preparation and biocompatibility evaluation of nanosized AS₂O₃/Fe₃O₄ complex and its therapeutic effect of thermochemotherapy on cervical cancer [D]. Nanjing: Southeast University, 2006. (in Chinese)

[9] 冷静, 苏 华. 纳米高分子材料在生物医学领域的研究与应用 [J]. 中国药事, 2007, 21(1): 35-37.

Leng J, Su H. Studies and application of nanometer polymeric materials in the field of biomedical [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2007, 21(1): 35-37. (in Chinese)

[10] 杨西晓, 陈建海, 任 非, 等. 丝裂霉素 C 聚氨基丙烯酸正丁酯纳米粒细胞毒性的研究 [J]. 中国药学杂志, 2004, 39(10): 758-759.

Yang X X, Chen J H, Ren F. Study on the cytotoxicity of mitomycin C polybutylcyanoacrylate nanoparticles [J]. Chin Pharm, 2004, 39(10): 758-759. (in Chinese)

[11] 张智星, 毛 靖, 冯祥礼, 等. 具有控释性能的可注射牙槽骨修复材料中 β-磷酸三钙的体外细胞毒性研究 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2008, 37(4): 544-545.

Zhang Z X, Mao J, Feng X L, et al. In vitro cytotoxicity study on β-tricalcium phosphate in a novel injectable alveolar replacement material for controlled delivery of tetracycline by MTT assay [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong: Med Sic Ed, 2008, 37(4): 544-545. (in Chinese)

[12] 王存英, 潘显道, 魏贤勇. 抗肿瘤药长春碱衍生物构效关系的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2004, 33(4): 38-40.

Wang C Y, Pan X D, Wei X Y. Research advancement of anti-tumor drug vinblastine derivant structures and effect relationship [J]. Bull Med Res, 2004, 33(4): 38-40. (in Chinese)

[13] Sanna S, Leena L, Maija K, et al. Effect of cell differentiation and passage number on the expression of efflux proteins in wild type and vinblastine-induced Caco-2 cell lines [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007, 67: 548-554.

[14] 赵 澎. RNA 干扰技术(RNAi)逆转神经胶质瘤细胞多药耐药性的实验性研究[D]. 北京: 首都医科大学, 2006.

Zhao P. Reversion of multidrug resistance (MDR) in human glioma cell line by RNA interference (RNAi) [D]. Beijing: Capital Medical University, 2006. (in Chinese)