

# 普鲁兰基肿瘤靶向性纳米粒子的制备、稳定性和体外释放\*☆◆

唐红波<sup>1,2</sup>, 陈红丽<sup>3</sup>, 周志敏<sup>2</sup>, 张彤<sup>2</sup>, 刘玲蓉<sup>2</sup>, 张其清<sup>2,4</sup>

## Tumor-targeted nanoparticles derived from pullulan acetate conjugate: Preparation, stability and release *in vitro*

Tang Hong-bo<sup>1</sup>, Chen Hong-li<sup>3</sup>, Zhou Zhi-min<sup>2</sup>, Zhang Tong<sup>2</sup>, Liu Ling-rong<sup>2</sup>, Zhang Qi-qing<sup>2,4</sup>

### 文章亮点:

采用透析法成功将叶酸取代度较高的材料制备成了纳米粒子: ①制备过程中去除有机溶剂的方法简单。②纳米粒子均呈规则球形, 比较均匀, 粒径适中, 分散度小。③载药纳米粒子的制备采用物理包埋法, 将脱盐后的表阿霉素药物溶解于有机溶剂中, 与乙酰普鲁兰叶酸偶合体按照一定比例进行混合, 药物能有效释放。

### Abstract

**BACKGROUND:** Pullulan due to its many unique characteristics have received more and more attention in the field of drug delivery systems. But, the tumor targeted nano-drug carriers based on pullulan needed to be further studied and developed.

**OBJECTIVE:** To observe the stability and drug release *in vitro* of nano-drug carriers and to preliminarily evaluate the potential of folate conjugated pullulan acetate (FPA) as a nano-drug carrier.

**METHODS:** Folate was coupled to pullulan acetate (PA). FPA nanoparticles (FPAN) and epirubicin-loaded FPA nanoparticles (FPA/EPI) were prepared by dialysis method. The storage stability of FPAN and FPA/EPI was observed by storage method, and the *in-vitro* release characteristics were studied by dialysis bag method.

**RESULTS AND CONCLUSION:** FPAN and FPA/EPI had the nearly spherical shape with a size range of (204.2±10.9) nm and (273.4±11.0) nm, respectively, and they had low  $\zeta$  potentials both in water and in 10% fetal bovine serum. FPAN maintained stable for at least 1 year. The drug encapsulated in FPAN was released more quickly in pH 5.0 PBS than in pH 7.4. It is concluded that the FPA nano-drug carrier is easy to prepare and has good stability. FPA and FPA/EPI nanoparticles have the potential to be new tumor-targeted nano-drug delivery systems.

Tang HB, Chen HL, Zhou ZM, Zhang T, Liu LR, Zhang QQ. Tumor-targeted nanoparticles derived from pullulan acetate conjugate: Preparation, stability and release *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(34): 6326-6330. [<http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html>]

### 摘要

**背景:** 普鲁兰多糖以其独特的优点在纳米递药系统领域受到越来越多的关注, 但是, 以普鲁兰多糖为材料进行改性制备的肿瘤靶向的纳米药物载体仍有待进一步研究与开发。

**目的:** 观察纳米粒子和载药纳米粒子的体外稳定性及所加载药物的释放特征, 初步评价其作为纳米药物载体的潜力。

**方法:** 应用透析法制备乙酰普鲁兰叶酸偶合体纳米粒子, 以表阿霉素为模型药物, 制备乙酰普鲁兰叶酸偶合体/表阿霉素载药纳米粒子(FPA/EPI), 应用储存法考察其稳定性, 应用透析袋法观测体外释放特征。

**结果与结论:** 乙酰普鲁兰叶酸偶合体纳米粒子和 FPA/EPI 的粒径分别为(204.2±10.9) nm 和(273.4±11.0) nm, 在蒸馏水和体积分数 10%胎牛血清中表面电位均较低, 乙酰普鲁兰叶酸偶合体纳米粒子在水溶液中粒径 1年内未见显著改变。载药纳米粒子对所加载的药物表阿霉素进行很好地释放, pH 5.0 磷酸盐缓冲液中释放速度明显高于 pH 7.4; 乙酰普鲁兰叶酸偶合体纳米粒子和 FPA/EPI 制备容易, 稳定性好, 初步说明了两种粒子可望成为新型肿瘤靶向药物递药系统。

**关键词:** 乙酰普鲁兰; 叶酸受体; 纳米粒子; 稳定性; 体外释放

**缩略语:** 乙酰普鲁兰叶酸偶合体纳米粒子: folate conjugated pullulan acetate, FPA; 乙酰普鲁兰叶酸偶合体纳米粒子: folate conjugated pullulan acetate nanoparticles, FPAN; 乙酰普鲁兰叶酸偶合体/表阿霉素载药纳米粒子: epirubicin-loaded FPA nanoparticles, FPA/EPI

唐红波, 陈红丽, 周志敏, 张彤, 刘玲蓉, 张其清. 普鲁兰基肿瘤靶向性纳米粒子的制备、稳定性和体外释放[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(34):6326-6330. [<http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html>]

<sup>1</sup>Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100007, China; <sup>2</sup>Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China; <sup>3</sup>The Key Laboratory of Hereditary Disease and Molecular Target Drug Therapy, Department of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; <sup>4</sup>Research Center of Biomedical Engineering, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Tang Hong-bo\*☆, Doctor, Pharmacist in charge, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100007, China; Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China tanghongbo77@gmail.com

Corresponding author: Zhang Qi-qing, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China; Research Center of Biomedical Engineering, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China zhangqiq@126.com

## 0 引言

普鲁兰多糖是一种重要的天然多糖, 由于具有良好的耐酸碱性, 可塑性强, 成膜性好, 透气性低, 无吸湿性, 水溶液黏度明显低于其他多糖溶液, 近年来, 科研人员将其作为一种良好的生物材料运用在药物、基因递送和组织工程等领域<sup>[1-3]</sup>。

叶酸是一种有效的肿瘤靶向配体, 随着纳米药物载体研究的逐渐广泛和深入<sup>[4-8]</sup>, 叶酸靶向纳米粒子和胶束备受关注<sup>[9-14]</sup>。

本实验中, 首次采用透析法制备了乙酰普鲁兰叶酸偶合体纳米粒子(folate conjugated pullulan acetate nanoparticles, FPAN), 以表阿霉素为模型药物制备具有肿瘤靶向特性的乙酰普鲁兰叶酸偶合体/表阿霉素载药纳米粒子(epirubicin-loaded FPAN, FPA/EPI), 并应用透射电镜、扫描电镜及动态光散射等技术对纳米粒子进行形态及粒径的表征; 同时, 考察了纳米粒子和载药纳米粒子的体外稳定性及释放特征。

## 1 材料和方法

**设计:** 基础实验研究。

**时间及地点:** 于2009/2010-04在中国医学科学院生物医学工程研究所完成。

**材料:** 普鲁兰多糖购于Hayashibara公司; 叶酸购于Sigma公司; 4-二甲氨基吡啶(DMAP)购于Sigma-Aldrich; N, N'-二环己基碳二亚胺(DCC)购于上海延长生化有限公司产品; 盐酸表阿霉素购于浙江海正药业有限公司; 透析膜购于中奥天元化学试剂有限公司; 激光粒度分析仪购于马尔文仪器有限公司(英国); VarioScan Flash全波长多功能读数仪购于赛默飞世尔科技有限公司; Tecnai G2 F20场发射透射电镜购于荷兰菲利普; JSM-6700F型场发射扫描电镜购于日本电子株式会社。

**方法:**

乙酰普鲁兰和乙酰普鲁兰叶酸偶合体(folate conjugated pullulan acetate, FPA)的合成及表征: 按文献<sup>[15-16]</sup>方法合成并干燥乙酰普鲁兰, 得到

白色疏松粉末。参考本室前期方法合成FPA<sup>[17]</sup>, 将1.0 g(2.27 mmol)叶酸加入到15 mL二甲基亚砜(DMSO)中, 加入5滴三乙胺, 搅拌至叶酸完全溶解, 溶液中再加入0.9 g (4.36 mmol)二环己基碳二亚胺及0.25 g (2.05 mmol)4-二甲氨基吡啶(DMAP), 反应1 h, 再加入0.615 g (2.27 mmol)溶解于DMSO的乙酰普鲁兰溶液, 搅拌反应5 d。过滤除去1, 3-二环己基脲(DCU)沉淀, 静置24 h, 再次过滤, 滤液滴加入乙醇溶液中。离心后除去上清液, 用无水乙醇溶液反复洗涤至上清液无黄色, 在pH=10的NaCO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>缓冲溶液中透析24 h, 在蒸馏水中透析48 h, 冷冻干燥备用。采用比色法测定叶酸的取代度<sup>[17]</sup>, 应用核磁共振谱仪鉴定其结构。

**透析法制备FPAN及FPA/EPI:** 称取适量FPA溶解于DMSO/H<sub>2</sub>O(体积比9/1)的溶液中, 使浓度为10 mg/L, 采用透析法制备载药纳米粒子, 即将药液装入透析袋中, 避光透析, 透析袋截留相对分子质量为8 000~14 000, 透析液为去离子水, 开始间隔一两个小时换1次水, 换4次后间隔4~6 h换1次水, 总共透析48 h, 最终得到带黄色乳光的溶液。称取适量表阿霉素溶解于DMSO中, 使质量浓度为5 g/L, 加入2倍摩尔量三乙胺, 避光搅拌过夜使脱盐酸; FPA溶解于DMSO/H<sub>2</sub>O(体积比9:1)的溶液中, 使质量浓度为12.5 g/L。将药物和材料溶液按照1/4的比例进行充分混合, 采用以上方法制备载药纳米粒子, 形成带红色乳光的纳米悬液。

高速离心(20 000 r/m, 15 min, 4 °C)收集纳米粒子, 加入去离子水或者体积分数10%牛血清(10%FBS)进行重新分散至目的浓度。

**表阿霉素标准曲线的制备:** 精密称取表阿霉素适量(1.23 mg)溶解于1 mL水中, 用DMSO稀释并定容至10 mL, 表阿霉素质量浓度为123 mg/L, 进行2倍稀释7个浓度, 在485 nm处测定吸光度, 后5个浓度测定荧光强度(aex=485 nm, ema=595 nm)。以表阿霉素质量浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 制备标准曲线。

**载药量和包封率的测定:** 将纳米沉淀物用无菌塑料吸管吹散重新分散于双蒸水中并定容。取少量纳米悬液于9倍体积DMSO中溶解, 用紫

Supported by: the National Major Scientific Research Program of China. No. 2006CB933300\*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.34.012

Received: 2012-02-05  
Accepted: 2012-06-28

<sup>1</sup>首都医科大学附属北京妇产医院药剂科, 北京市100007; <sup>2</sup>中国医学科学院生物医学工程研究所, 天津市生物材料重点实验室, 天津市300192; <sup>3</sup>新乡医学院生命科学与技术系, 河南省遗传性疾病与分子靶向药物重点实验室, 河南省新乡市453003; <sup>4</sup>厦门大学材料学院生物材料系/生物医学工程研究中心/福建省生物医学工程重点实验室/厦门市生物医学工程研究中心, 福建省厦门市361005

唐红波☆, 女, 1977年生, 湖南省长沙市人, 2010年北京协和医学院毕业, 博士, 主管药师, 主要从事妇科肿瘤靶向纳米药物和医院药学方面的研究。  
tanghongbo77@gmail.com

通讯作者: 张其清, 博士, 教授, 博士生导师, 中国医学科学院生物医学工程研究所, 天津市生物材料重点实验室, 天津市300192; 厦门大学材料学院生物材料系/生物医学工程研究中心/福建省生物医学工程重点实验室/厦门市生物医学工程研究中心, 福建省厦门市361005  
zhangqiq@126.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344(2012)34-06326-05

收稿日期: 2012-02-05  
修回日期: 2012-06-28  
(20111005015/D·W)

外分光光度法测定在485 nm处测定吸收值, 根据EPI在DMSO/H<sub>2</sub>O(体积比9:1)中的标准曲线求出EPI浓度, 并按照公式计算药物的包封率和载药量。

$$\begin{aligned} \text{药物的包封率} &= \text{被包封的药物量} / \text{投入的总药量} \times 100\% \\ \text{药物的载药量} &= \text{被包封的药物量} / \text{载药纳米粒子的质量} \times 100\% \end{aligned}$$

**纳米粒子粒径分布及ζ电位:** 采用激光粒度分析仪测定纳米粒子粒径分布及ζ电位。将纳米悬液0.5~1.0 mL稀释成适当浓度放入比色杯中, 将比色杯放入粒度仪样品池中进行测试, 每个样品测试3次。

**纳米粒子透射电镜观察:** 将纳米悬液滴在碳支持膜上, 自然干燥后用2%的磷钨酸(pH 6.0)负染, 干燥后在透射电镜下进行观察。

**纳米粒子扫描电镜观察:** 将纳米悬液滴在硅板上, 干燥后喷铂金, 20 mA, 不连续喷金4 min, 在扫描电镜下进行观察。

**纳米粒子稳定性考察:** 将以上制备的FPAN和FPA/EPI溶液避光保存于4 °C, 采用激光粒度分析仪测定纳米粒子粒径及其分布, 每间隔1个月或几个月测定1次, 每个样品每次测定3次。

**对所加载药物的释放:** 将FPA/EPI悬液浓度调至0.5 mg/L, 取1 mL置于透析袋中。将透析袋浸入15 mL不同pH值的PBS(分别为pH 5.0和pH 7.4)中, 在恒温空气浴振荡器37 °C以100 r/min振摇。在预定的时间置换释放介质(每次置换2 mL), 样品浓度测定采用荧光分光光度法, 测定条件为λ<sub>ex</sub>=485 nm, λ<sub>em</sub>=585 nm, 每次每个样品3个复孔, 利用表阿霉素在DMSO/H<sub>2</sub>O(体积比9:1)中的标准曲线求出表阿霉素质量浓度, 并计算累计释放药物量。

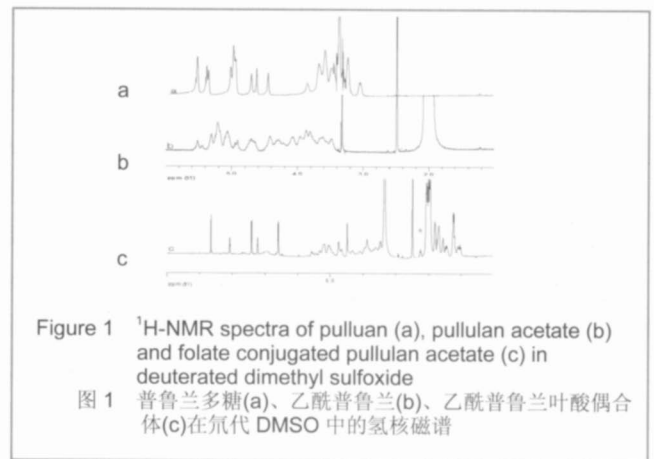
**主要观察指标:** 纳米粒子的表面电荷、粒径和形态, FPA/EPI在不同pH值溶液中的体外释放量。

**统计学分析:** 样本数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用统计学软件进行数据统计分析, 采用T-Test进行差异分析。

## 2 结果

**2.1 乙酰普鲁兰及FPA的表征及其取代度测定** 根据参考文献[15]进行计算, 乙酰普鲁兰的乙酰基取代度为2.6; 图1a为普鲁兰多糖的<sup>1</sup>H NMR谱, 从图1b中可以观察到乙酰普鲁兰的<sup>1</sup>H NMR谱, 图1c为FPA的<sup>1</sup>H NMR谱, 由图1c可见, 叶酸的峰为δ6.75(2H, FA苯环H3', 5'位2H), 7.63(2H, FA苯环H2', 6'位2H), 8.77(1H, FA 7位1H)。此外, 叶酸的羧基与乙酰普鲁兰多糖上的羟

基偶联后, 叶酸的H化学位移从2.33移向1.20, 说明叶酸与乙酰普鲁兰进行了化学连接, 比色法测得其取代度为0.235。



**2.2 FPAN和FPA/EPI的粒径大小及分布特征** 大体观察两种溶液具有明显的黄色和红色乳光。动态光散射法测定FPAN和FPA/EPI的粒径分别为[(204.2±10.9) nm, n=3]和[(273.4±11.0) nm, n=3], 粒径比较均匀, 分散度均小于0.2, 分别为0.172±0.036和0.165±0.026; 纳米粒子对所加载的药物表阿霉素的载药量和包封率分别为[(6.70±1.32)%, n=6]和[(71.98±14.99)%, n=6]。透射电镜和扫描电镜观察见图2, 3, 各纳米粒子呈规则球形, 表面光滑。

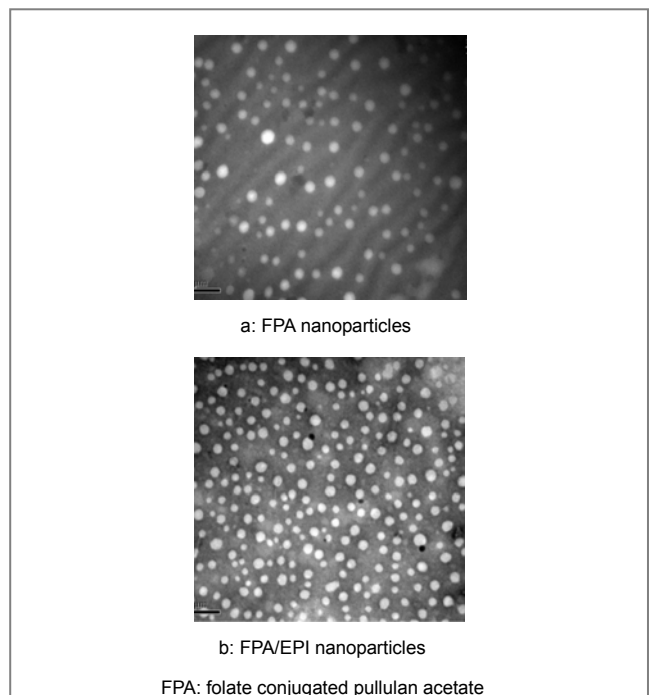
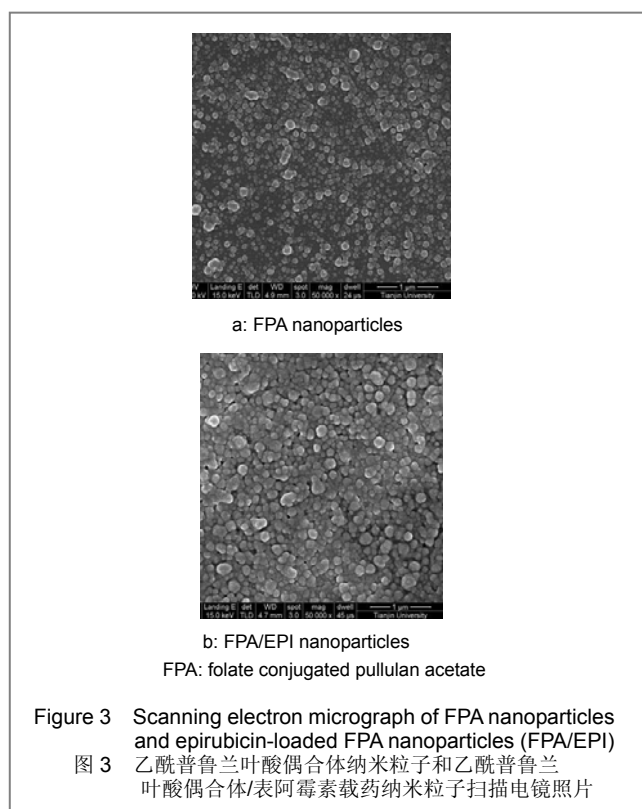


Figure 2 Transmission electron micrograph of FPA nanoparticles and epirubicin-loaded FPA nanoparticles (FPA/EPI)  
图2 乙酰普鲁兰叶酸偶合体纳米粒子和乙酰普鲁兰叶酸偶合体/表阿霉素载药纳米粒子透射电镜照片



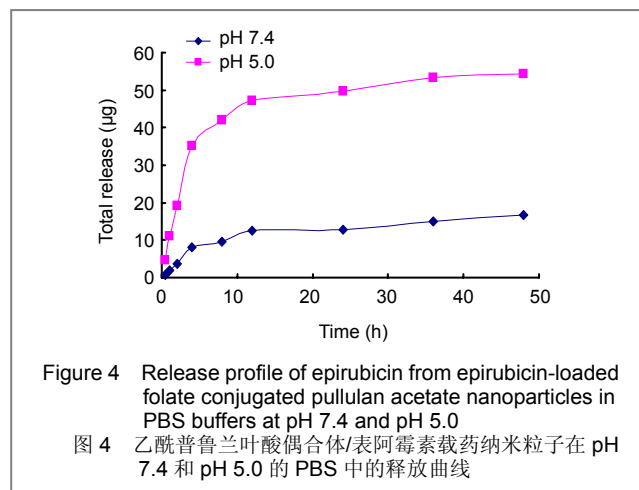
**2.3 不同介质中的 $\zeta$  电位** FPAN和FPA/EPI在去离子水溶液中的 $\zeta$  电位分别为 $(-8.400 \pm 4.951)$  mV和 $(-10.288 \pm 2.748)$  mV。为了进一步模拟体内环境, 实验考察了纳米粒子在体积分数为10%胎牛血清中的电位, FPAN和FPA/EPI在10%FBS中的 $\zeta$  电位分别为 $(-0.731 \pm 0.998)$  mV和 $(0.632 \pm 0.279)$  mV, 绝对值显著低于在水溶液的电位。

**2.4 表阿霉素标准曲线的测定** 本次实验中包封率及载药量采用紫外分光光度法测定, 药物释放采用荧光分光光度法测定。表阿霉素在DMSO中紫外-可见分光光度计485 nm处测定的直线方程为:  $Y=0.0045 + 0.0108X (R^2=0.9999)$ , 用于包封率及载药量的测定。在DMSO中的浓度-荧光标准曲线直线方程为:  $Y=1.3508 + 6.7895X (R^2=0.999)$ , 用于体外释放的药物浓度测定。

**2.5 FPA/N的稳定性** 在4 °C条件下, 其粒径、粒径分布以及表面电荷在一年内未见明显改变, 说明纳米粒子在水溶液中稳定性好, 见表1。

| Time | Particle size (nm) | Dispersion index  | $\zeta$ potential (mV) |
|------|--------------------|-------------------|------------------------|
| 0 d  | 204.2 $\pm$ 10.9   | 0.172 $\pm$ 0.036 | -8.400 $\pm$ 4.951     |
| 1 yr | 199.8 $\pm$ 29.2   | 0.156 $\pm$ 0.015 | -6.013 $\pm$ 4.572     |

**2.6 FPA/EPI的体外释放特征** 对载药纳米粒子在不同pH值介质中的释放考察结果, 见图4, 释放48 h, pH=7.4的PBS纳米粒子释药仅为16.8  $\mu$ g, 而pH=5的PBS纳米粒子的释药可达54.3  $\mu$ g。随着释放介质pH值的降低, 表阿霉素自纳米粒子中的释放加快。



### 3 讨论

本次合成的乙酰普鲁兰乙酰基取代度为2.6, 合成的叶酸偶合体中叶酸取代度较高, 采用透析法将叶酸取代度较高的材料制备成了纳米粒子, 制备过程中需要去除的有机溶剂单一, 去除方法简单, 纳米粒子均呈规则球形, 比较均匀, 粒径适中, 分散度小。载药纳米粒子的制备采用物理包埋法, 表阿霉素被包埋在纳米粒子内或者吸附于纳米粒子表面。FPAN和FPA/EPI电荷近中性, 在体积分数10%FBS溶液中电位降低至接近于0, 可能与牛血清蛋白的吸附有关。研究表明, 与带电纳米粒子比较, 中性纳米粒子在体内巨噬细胞的吞噬明显减少<sup>[18-19]</sup>, 吞噬作用是纳米粒子的主要清除因素, 减少吞噬可能显著延长纳米粒子在体内的循环时间<sup>[20]</sup>, 因此, FPA/EPI和游离表阿霉素相比, 在体内可能具有更长的循环时间。

所加载的药物表阿霉素在pH值较高的PBS中释放速度低于较低pH值的PBS中, 主要与模型药物的性质有关, 表阿霉素含有氨基, 氨基质子化后可大大提高表阿霉素的水溶性, 所以表阿霉素在酸性条件下的水溶性显然大于中性或者碱性条件<sup>[21]</sup>。实验结果表明, FPAN对所加载药物具有明显的缓释作用。文献报道<sup>[22]</sup>, 肿瘤组织局部呈弱酸性, pH值4.0~5.0, 由以上体外释放实验的结果推测: 载药纳米粒子在体内pH 7.4左右的体液中药物释放比较缓慢, 至呈弱酸性的肿瘤组织局部时, 药物释放加速, 可能显示更好的肿瘤靶向作用。

上述结果表明, 采用透析法制备FPAN和FPA/EPI制备方法简单, 纳米粒子粒径比较均一, 稳定性好并能较好地释放。FPAN能对所包载的模型药物表阿霉素进行很好地释放, FPAN是一种有前景的纳米药物载体, FPA/EPI有望成为一种新型靶向抗肿瘤纳米药物。

#### 4 参考文献

- [1] Rekha MR, Chandra P, Sharma. Pullulan as a Promising Biomaterial for Biomedical Applications: A Perspective. Trends Biomater Artif Organs. 2007;20(2):116-121.
- [2] Leathers TD. Biotechnological production and applications of pullulan. Appl Microbiol Biotechnol. 2003;62:468-473.
- [3] Shingel KI. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. Carbohydr Res. 2004;339(3):447-460.
- [4] Leamon CP, Low PS. Cytotoxicity of momordin-folate conjugates in cultured human cells. J Biol Chem. 1992; 267(35):24966-24971.
- [5] Leamon CP, Pastan I, Low PS. Cytotoxicity of folate-pseudomonas exotoxin conjugates toward tumor cells, contribution of translocation domain. J Biol Chem. 1993; 268(33):24847-24854.
- [6] Zhang Q, Xiang GY, Zhang YJ. Increase of doxorubicin sensitivity for folate receptor positive cells when given as the prodrug N-(phenylacetyl) doxorubicin in combination with folate-conjugated PGA. J Pharm Sci. 2006;95(10):2266-2275.
- [7] Leamon CP, Reddy JA, Vlahov IR, et al. Synthesis and biological evaluation of EC72: a new folate-targeted chemotherapeutic. Bioconjug Chem. 2005;16(4):803-811.
- [8] Leamon CP, Reddy JA. Folate-targeted chemotherapy. Adv Drug Deliv Rev. 2004;56(8):1127-1141.
- [9] Hattori Y, Maitani Y. Enhanced in vitro DNA transfection efficiency by novel folate-linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer. J Control Release. 2004; 97(1):173-183.
- [10] Yoo HS, Park TG. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate. J Control Release. 2004;100(2): 247-256.
- [11] Vivechana D, Jeroen VB, Debra MS. Synthesis and grafting of thioctic acid-PEG-folate conjugates onto Au nanoparticles for selective targeting of folate receptor-positive tumor cells. Bioconjugate Chem. 2006;17(3):603-609.
- [12] Yoo HS, Park TG. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. J Control Release. 2004; 96(2):273-283.
- [13] Eun SL, Kun N, You HB. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor. J Control Release. 2005;103(2):405-418.
- [14] Bae YS, 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. Mol BioSyst. 2005;1(3):242-250.
- [15] Zhang HZ, Gao FP, Liu LR, et al. Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. Colloids Surf B Biointerfaces. 2009; 71(1):19-26.
- [16] Jung SW, Jeong YI, Kim SH. Characterization of hydrophobized pullulan with various hydrophobicities. Int J Pharm. 2003;254(2):109-121.
- [17] Zhang HZ, Li XM, Gao FP, et al. Preparation of folate-modified pullulan acetate nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. Drug Delivery. 2010;17(1): 48-57.
- [18] Levchenko TS, Rammohan R, Lukyanov AN, et al. Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. Int J Pharm. 2002;240(1-2):95-102.
- [19] Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. Mol Pharm. 2008;5(4):505-515.
- [20] Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. Mol Pharm. 2008;5(4):496-504.
- [21] Bonadonna G, Gianni L, Santoro A, et al. Drug ten years later: epirubicin. Ann Oncol. 1993;4(5):359-369.
- [22] Tong Z, Luo W, Wang Y, et al. Tumor tissue-derived formaldehyde and acidic microenvironment synergistically induce bone cancer pain. PLoS One. 2010;5(4):e10234.

来自本文课题的更多信息—

**基金声明:** 国家重大科学研究计划项目(批准号: 2006CB933300)。

**作者贡献:** 所有作者参与实验设计并参与文章审校, 第一作者和通讯作者进行实验评估, 第一作者进行试验实施, 参与实验评估, 进行资料收集, 成文, 对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**本文创新性:** 应用普鲁兰多糖进行改性, 制备叶酸连接偶合物乙酰普鲁兰叶酸偶合体, 将此材料应用透析法制备纳米粒子和载药纳米粒子尚未见文献报道, 对于进一步研究与开发新型肿瘤靶向纳米递药系统具有重要意义。