# 载紫杉醇的 PEG 修饰的大黄酸偶联物胶束的细胞摄取及活体成像研究

李崇仙,王夏英,陆伟利,郑雅玲,许雪雅,王晓颖\*,徐伟\*(福建中医药大学,福州 350122)

摘要:目的 探究载紫杉醇(paclitaxel, PTX)的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰的大黄酸偶联物胶束的细胞摄取 及活体成像情况。方法 将环境响应型荧光探针 P4/P2 与药物 PTX 共载于 mPEG-羧甲基壳聚糖-大黄酸(CRmP)偶联物胶 束中,制备(P4+PTX)/CRmP 胶束。以 MCF-7 细胞为细胞模型,利用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪分析该胶束被 MCF-7 细胞摄取的情况;以 H22 皮下移植瘤小鼠为模型,在体和离体成像分析该胶束在体内的分布情况。结果 (P4+PTX)/CRmP 胶束以完整的胶束形式被 MCF-7 细胞内吞摄入,分布于细胞质。(P2+PTX)/CRmP 胶束在荷瘤小鼠的肝脏和肿瘤部位较 多聚集,并于实验时间内在肿瘤部位不断累积。结论 该胶束以完整的胶束形式被肿瘤细胞摄取,在体内有一定的肝靶 向性和肿瘤靶向性。

 关键词:紫杉醇;PEG 修饰的羧甲基壳聚糖-大黄酸偶联物;聚合物胶束;细胞摄取;活体成像

 中图分类号:R965.2
 文献标志码:A
 文章编号:1007-7693(2023)13-1753-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223352

引用本文:李崇仙,王夏英,陆伟利,等. 载紫杉醇的 PEG 修饰的大黄酸偶联物胶束的细胞摄取及活体成像研究[J]. 中国现代应用药学,2023,40(13):1753-1758.

#### Study on Cellular Uptake and in Vivo Imaging of Paclitaxel-loaded PEG-modified Rhein Conjugate Micelles

LI Chongxian, WANG Xiaying, LU Weili, ZHENG Yaling, XU Xueya, WANG Xiaoying<sup>\*</sup>, XU Wei<sup>\*</sup>(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the cellular uptake and *in vivo* imaging of paclitaxel(PTX)-loaded polyethylene glycol(PEG)-modified rhein conjugate micelles. **METHODS** (P4/P2+PTX)/CRmP micelles were prepared by co-loading environment-responsive fluorescent probes P4/P2 and PTX into CRmP micelles. Using MCF-7 cells as cell models, the uptake of the micelles by MCF-7 cells was analyzed by laser confocal microscopy and flow cytometry. The H22 subcutaneous transplanted tumor mice were used as animal models, and the distribution of the micelles *in vivo* and *in vitro* were analyzed by *in vivo* imaging system. **RESULTS** (P4+PTX)/CRmP micelles in the intact form were internalized by MCF-7 cells and distributed in the cytoplasm. (P2+PTX)/CRmP micelles were more accumulated in the liver and tumor sites *in vivo*, and gradually accumulated at the tumor sites during the experimental time. **CONCLUSION** The intact micelles can be taken up by tumor cells, and have liver and tumor targeting properties *in vivo*.

**KEYWORDS:** paclitaxel; PEG-modified carboxymethyl chitosan-rhein conjugate; polymer micelles; cellular uptake; *in vivo* imaging

聚合物胶束(polymeric micelles, PMs)因其较好的载药和释药特征,简便的制备方法,良好的生物相容性和肿瘤靶向性而被广泛用作药物递送和癌症治疗的纳米载体<sup>[1]</sup>。利用聚合物胶束形成时疏水嵌段相互缔结的作用力,将疏水性药物包载进胶束内核,从而可以改善疏水性药物的溶解度<sup>[2-4]</sup>。聚合物胶束的纳米尺寸使它们能够通过增强的渗透性和滞留(enhanced permeability and retention, EPR)

效应积累到肿瘤微环境中[5-6]。

聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)是一种具 有独特亲水性和电中性的高分子材料。表面修饰 PEG 是改善纳米粒子生物物理和化学性质的关键 因素,且使粒子在蛋白质黏附和巨噬细胞去除中 得到有效缓解<sup>[7-8]</sup>。

羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMCS)是集水溶性、生物相容性、生物降解性、

**作者简介:** 李崇仙,女,硕士生 E-mail: 3580181437@qq.com \*通信作者: 王晓颖,女,博士,教授 E-mail: wangxy623@yeah.net 徐伟, 男,博士,教授 E-mail: 2000017@fjtcm.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(81603301);福建省科技厅引导性项目(2020Y0050)

低毒性、稳定性于一体的壳聚糖衍生物<sup>[9]</sup>。CMCS 良好的可修饰性来源于其官能团,例如-NH<sub>2</sub>、 -COOH。因此,CMCS作为药物载体在医药领域 中被广泛使用<sup>[10]</sup>。大黄酸是中药大黄的有效成分 之一,具有抗炎、抗肿瘤、抗肿瘤血管生成等作 用<sup>[11-12]</sup>,并能够与抗肿瘤药物紫杉醇(paclitaxel, PTX)协同作用<sup>[13]</sup>。

笔者所在课题组前期以 PEG 修饰的羧甲基壳 聚糖为骨架,基于大黄酸协同 PTX 抗肿瘤特性, 接枝小分子大黄酸作为疏水性部分, 合成了两亲 性 mPEG-羧甲基壳聚糖-大黄酸偶联物(CRmP 偶 联物),其在水中自组装形成聚合物胶束;以PTX 为模型药物,进行物理包载,得到形态、结构特 征明确的载 PTX 的 CRmP 胶束(PTX/CRmP 胶束), 该胶束能增加 PTX 的水溶性,提高 PTX 的抗肿瘤 效果。笔者所在课题组前期利用红外光谱(FT-IR) 和核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)对 CRmP 偶联物进行结 构表征, 通过动态激光粒径仪(dynamic laser particle size analyzer, DLS)和原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)对 PTX/CRmP 纳米胶束的 粒径与形态进行表征,通过 MTT 法评估 CRmP 偶 联物和PTX/CRmP纳米胶束对MCF-7细胞的细胞 毒性<sup>[13]</sup>。结果显示, CRmP 偶联物具有良好的安 全性, 随给药时间的延长, PTX/CRmP 纳米胶束 在相同药物浓度下表现出优于 Taxol<sup>®</sup>的体外抗肿 瘤活性。为进一步研究该胶束在细胞和动物体内的 分布情况,本研究将该胶束包载环境响应型荧光探 针,利用细胞模型及荷瘤小鼠模型,对其进行细胞 摄取和活体成像研究。

#### 1 材料

1.1 药品与试剂

紫杉醇(上海中西三维药业有限公司, 批号: ST201610001; 纯度≥98%); P4/P2 荧光探针由上 海复旦大学自制提供; CRmP 偶联物(自制, 大黄 酸取代度 7.6%); 透析袋(上海绿鸟科技发展有限 公司, 型号: MWCO14000); MEM 培养基(Invitrogen 公司, 批号: 11090081); 4%多聚甲醛通用型组织 固定液(Birshop 公司, 批号: BL539A); Hoechst 33342(Meilunbio, 批号: 23491-52-3); 磷酸盐缓 冲液(1×)(批号: 22059494)、0.25%胰蛋白酶(1×)(批 号: J190031)、青霉素链霉素溶液(批号: J20029) 均购自美国 HyClone<sup>TM</sup>公司。

## 1.2 仪器

MS105DU 型电子天平[梅特勒-托利多仪器

(上海)有限公司]; JY92-2D 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); ALPHA1-2 LD 型冷冻干燥机(德国 Christ 公司); LSM710 型激光 共聚焦显微镜(德国蔡司公司); FACSCalibur 型流 式细胞仪(美国碧迪公司); Thermo 311 型细胞培养 箱(美国 Thermo 公司); IVIS 活体成像荧光系统仪 (美国珀金埃尔默股份有限公司)。

1.3 细胞与动物

人乳腺癌细胞(MCF-7)购自中国科学院细胞 库。清洁级 ICR 小鼠, ♂, 体质量(20±2)g, 购于 吴氏动物中心。动物生产许可证号: SCXK(沪) 2016-0002; 合格证号: 2018000510392。

2 方法

**2.1** 共载 P4/P2 和 PTX 的 CRmP 偶联物胶束的 制备

称取 CRmP 偶联物 18 mg,加人 2.6 mL 蒸馏 水,室温下使其充分溶解,形成 CRmP 胶束溶液。 将 12 mg PTX 溶于 200 µL P4(取适量 P4 的甲醇溶 液旋蒸除去甲醇,加入适量不含血清的培养基超 声混匀,使其终浓度为 250 µg·mL<sup>-1</sup>,避光处理) 的甲醇溶液中,或 P2(取 2 mg P2 于 250 mL 量瓶 中,用甲醇溶解定容,配置成 8 µg·mL<sup>-1</sup>母液备用) 的甲醇溶液中,超声溶解并混匀,将其分别逐滴 加至 CRmP 胶束溶液中,剧烈搅拌 20 min,冰水 浴探头超声 30 min, 12 h 后结束透析,冰水浴探 头超声 20 min, 186.3 ×g 离心 5 min,取上清液, 即得共载 P4 和 PTX 的 CRmP 偶联物胶束,即 (P4+PTX)/CRmP 胶束;或共载 P2 和 PTX 的 CRmP 偶联物胶束,即(P2+PTX)/CRmP 胶束。

2.2 细胞培养

MCF-7 细胞,加入至含有 10% FBS、1%青链 霉素的 RPMI-1640 培养液,置于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中,隔天换液。当细胞贴壁达到约为 80%~ 90%,细胞贴壁生长时即可进行传代培养。

## 2.3 细胞摄取

**2.3.1** 细胞摄取试验 将 MCF-7 细胞以 2×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup> 的密度接种于激光共聚焦培养皿上, 贴壁后弃去培养液, 加入 37 ℃预热的 HBSS 轻轻 冲洗细胞 2 次, 加入(P4+PTX)/CRmP 胶束溶液 0.5 mL(含 0.32 µg·mL<sup>-1</sup> P4), 孵育 2 h 后, 弃去胶 束溶液, 加入 4 ℃的冰冷 HBSS 终止摄取, 清洗 细胞 3 次。弃去 HBSS,用 4%多聚甲醛固定 20 min, 冷的 HBSS 清洗 3 次, 加入 10 µg·mL<sup>-1</sup> 细胞核染

色液 Hoechst 33342 1 mL 继续孵育 15 min,用冷的 HBSS 清洗 3 次,加入 200 μL HBSS 用于激光 共聚焦显微镜下观察并拍照。游离 P4 溶液(含 0.32 μg·mL<sup>-1</sup> P4)同法操作作为对照。

2.3.2 流式细胞仪半定量试验 将 MCF-7 细胞以 3×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup> 的密度接种于 6 孔板上,培养至贴壁 后弃去培养液,用 HBSS 轻轻冲洗细胞 3 次,加入(P4+PTX)/CRmP 胶束溶液 1 mL,于 37 ℃孵育 2 h 后,移除胶束溶液,加入 1 mL 冷的 HBSS 终止摄取,清洗细胞 3 次。加入消化液(0.25%胰酶加 0.1%EDTA)消化细胞,用含血清的培养基终止消化,轻轻吹打混匀细胞。收集细胞,离心,用 1 mL HBSS 洗 3 次,再次离心,加入 0.4 mL HBSS 制成 细胞悬液,加到流式管中避光处理,在 1 h 内进行 测试。游离 P4 溶液同法操作作为对照。

2.4 活体成像

2.4.1 小鼠 H-22 皮下移植瘤模型的建立 取冻存的 H-22 细胞复苏,常规培养。用 1 mL 无菌注射器吸取 H-22 细胞悬浮液于 ICR 小鼠左侧腋下注射 0.1 mL,实时观察肿瘤生长情况,当腋下出现肿瘤硬块且体积在 150~200 mm<sup>3</sup> 左右时,即可开始分 组给药。

**2.4.2** 给药与分组 取 6 只荷瘤小鼠随机分成 2 组,每组 3 只,分别尾静脉注射 P2 的生理盐水溶 液和(P2+PTX)/CRmP 胶束,注射后于 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 时间点进行活体荧光拍摄。另 取 42 只荷瘤小鼠,分别注射 P2 的生理盐水溶液(含 5 μg·mL<sup>-1</sup> P2)和(P2+PTX)/CRmP 胶束(含 5 μg·mL<sup>-1</sup> P2)后,于上述相应时间点处死小鼠并解剖(*n*=3), 取心、肝、脾、肺、肾组织,除去表面血块后,进行组织荧光拍摄。

#### 3 结果

## 3.1 细胞摄取试验

为了考察 CRmP 胶束以胶束完整的形式被细胞摄取还是释药后药物以游离的形式被细胞摄取, 采用激光共聚焦显微镜定性观察和流式细胞仪定 量测定的方法对共载 P4 与 PTX 的(P4+PTX)/CRmP 胶束在 MCF-7 细胞中的摄取情况进行研究。激光 共聚焦显微镜拍摄的 MCF-7 细胞摄取结果见图 1A。图中红色荧光信号是由 P4 荧光探针发出,蓝 色荧光信号是由 Hoechst 33342 染色的细胞核。游 离的 P4 溶液处于水环境中,荧光淬灭,因此只能 观察到蓝色的细胞核,而(P4+PTX)/CRmP 胶束组 的荧光主要分布在细胞核(蓝色荧光)周围,说明完整的胶束主要分布于细胞质。

同时, 给予 MCF-7 细胞相同浓度的测试溶液 并通过流式细胞仪分析, 其结果见图 1B~C。游离 P4 溶液的荧光强度极弱, 可认为是细胞自身所发 出的荧光, 而(P4+PTX)/CRmP 胶束的荧光强度是 游离 P4 的 1 500 倍, 表明(P4+PTX)/CRmP 胶束是 以完整胶束的形式被 MCF-7 细胞内吞摄入, 这些 结果与激光共聚焦显微镜观察的结果一致。



**图 1** MCF-7 细胞对(P4+PTX)/CRmP 胶束的摄取 A-MCF-7 细胞的激光共聚焦摄取图; B-流式细胞术检测 MCF-7 细胞 的摄取图; C-流式细胞术检测 MCF-7 细胞的摄取荧光强度; 与 P4 组 相比, <sup>1)</sup>P<0.01。

Fig. 1 Uptake of (P4+PTX)/CRmP micelles in MCF-7 cells A-uptake imaging in MCF-7 cells detected by laser confocal; B-uptake imaging in MCF-7 cells detected by flow cytometry; C-fluorescence intensity in MCF-7 cells detected by flow cytometry; compared with P4 group,  $^{10}P$ <0.01.

## 3.2 活体成像试验

以共载 P2 和 PTX 的 CRmP 胶束考察其体内 分布情况。P2 为环境响应型荧光探针,在水中发 生聚集而淬灭。因此,荷瘤小鼠尾静脉注射 P2 生理盐水溶液后,荷瘤小鼠全身无荧光显示;但 尾静脉注射(P2+PTX)/CRmP 胶束后,在1,2,4, 8,12,24 h时,荷瘤小鼠腹部均显示荧光,见图 2A。随时间的推移,荷瘤小鼠腹部荧光强度逐渐 增强,在 8 h 达到峰值,随后荧光强度逐渐减弱, 见图 2D。

注射后在不同时间点解剖荷瘤小鼠后,取各 主要脏器和肿瘤组织观察荧光,结果见图 2B~C。 P2 溶液组在各脏器和肿瘤中几乎不呈现明显荧 光,而(P2+PTX)/CRmP 胶束组小鼠的心、肝、 脾、肺、肾和肿瘤中均能观察到荧光。这意味着 完整的共载 P2和 PTX的 CRmP 胶束可能被吸收 和转移至这些器官和组织。由图 2E 可知,在各 脏器中,肝脏呈现较强的荧光,在 8h 达到峰值, 随后减弱,可能是由于肝脏具有丰富的血流,并 且是体内的主要代谢器官,因此,在肝脏中观察 到较强的荧光。在测试时间内,肿瘤组织的荧光 强度逐渐增强,并在 24 h 达到最高,说明完整 的(P2+PTX)/CRmP 胶束在肿瘤部位不断累积, 从而引起肿瘤部位的荧光逐渐增强。上述结果表 明,(P2+PTX)/CRmP 胶束具有一定肝靶向性和 肿瘤靶向性。



图2 荷瘤小鼠在体和离体荧光成像和荧光强度

A-P2 组(生理盐水)和(P2+PTX)/CRmP 胶束组荧光成像; B-离体脏器荧光成像(从上至下:心、肺、肝、脾、肾); C-离体肿瘤荧光成像; D-全身 荧光强度; E-离体脏器和肿瘤荧光强度。

Fig. 2 In vivo and in vitro fluorescence imaging and fluorescence intensity in tumor-bearing mice

A-P2 group(normal saline) and (P2+PTX)/CRmP micelles fluorescence imaging; B-*in vitro* organ fluorescence imaging(from top to bottom: heart, lung, liver, spleen, kidney); C-*in vitro* tumor fluorescence imaging; D-whole-body fluorescence intensity; E-fluorescence intensity of organs and tumors *in vitro*.

### 4 讨论

聚合物胶束具有壳-核结构、稳定的热力学性 质,能够提高难溶性药物溶解性,使多种难溶性 药物的体内递送的难题得到解决。本研究将 PTX 载入 CRmP 胶束中,形成 PTX/CRmP 胶束,利用 胶束在体内的长循环、靶向性,将 PTX 递送到肿 瘤部位,以此达到治疗肿瘤的目的。前期细胞毒 性试验已证明 PTX/CRmP 胶束具有时间依赖性和 浓度依赖性的肿瘤细胞杀伤作用<sup>[14]</sup>,因此,本实 验对该载药胶束进入肿瘤细胞的形式以及分布于 肿瘤细胞的部位进行了进一步研究。实验结果证 实了该胶束以完整胶束形态被肿瘤细胞摄取,解 释了前期研究中其细胞毒作用随时间增强的原 因。其分布于细胞质,有利于 PTX 发挥抑制微管 解聚从而抗肿瘤的作用。

P4和P2近红外荧光探针由上海复旦大学药学院吴伟教授课题组研发,该荧光探针为4,4'-二氟-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-并二苯(BODIPY)或 aza-BODIPY 结构。此荧光探针通过环境响应聚集引起猝灭,即具有团聚淬灭(aggregation-caused quenching, ACQ)效应<sup>[15-16]</sup>。ACQ 荧光团(P2 或 P4)存在于聚合物胶束的疏水内核中时发出强烈荧光,但当它们离开疏水环境将在水中自聚集,荧光会立即完全猝灭<sup>[17]</sup>,从而可以指示胶束是以完整形态或者解聚状态存在<sup>[18]</sup>。本研究通过比较 P4 水溶液和(P4+PTX)/CRmP 胶束中 P4 的荧光强度,证明了共载 P4 和 PTX 的 CRmP 胶束是以完整的胶束形式进入肿瘤细胞并被摄取。这为进一步研究胶束在体内的抗肿瘤作用提供了一定的理论基础。

小动物活体成像采用荧光技术构建肿瘤转移 医学模型,利用活体成像技术的高灵敏性检测肿 瘤病灶,可快速测量小鼠肿瘤生长、转移,以及 对药物的反应<sup>[19]</sup>。本研究采用 P2 的荧光特性结合 小动物活体成像技术,成功将 P2 作为 CRmP 胶束 的示踪剂应用到考察其在小鼠体内的肿瘤靶向性 和组织分布中。以 P2 溶液为对照,通过在体和离 体成像,清楚地观察到荷瘤小鼠在体腹部、离体 主要脏器及肿瘤组织中的完整胶束的分布,并能 够通过荧光强度来指示其在体内的动态分布。该 技术能够配合解释载药胶束抗肿瘤作用及减毒效 果,为药效学进一步研究奠定基础。该技术也需 进一步与其他研究手段联用:从药动学的角度, 将药物分为游离 PTX 组、PTX/CRmP 胶束组,对 小鼠进行摘眼球处理,结合超高效液相-质谱联用 技术(UPLC-MS),绘制血药浓度曲线及药动学参 数阐述载药胶束能否增加 PTX 在血液中的循环时 间及体内长循环作用;并且该技术可以结合 UPLC-MS测定不同脏器组织中药物含量来进一步 说明载药胶束在体内的分布情况及肿瘤靶向性。 总的来说,活体成像技术可以结合药动学、组织 分布等研究,更加全面解释说明 PTX/CRmP 胶束 体内药动学特征及肿瘤靶向性,笔者所在课题组 将针对这些方面进一步研究。

在活体成像试验中,荷瘤小鼠腹部及各脏器 显示出荧光强度逐渐增强,达到峰值,然后减弱 的趋势;但离体的肿瘤组织荧光强度显示,在测 定时间内,荧光不断地增强,在24h达到峰值。 说明载药胶束在体内通过血液循环不断地在肿瘤 部位累积,可能由于胶束的长循环和肿瘤组织的 EPR 效应,使其被动靶向肿瘤,在肿瘤部位累积 后有利于杀伤肿瘤细胞。但在实验设置时间内尚 未观察到肿瘤内荧光减弱趋势,有待今后通过增 加测定时间进一步研究,以便更好地说明该胶束 在肿瘤部位的滞留时间和靶向性。

致谢:本项目在闽台中药分子生物技术国家 地方联合工程研究中心、福建省中药学重点实验 室、福建省中药资源研究与开发利用重点实验室 完成。感谢吴伟教授和赵伟利教授赠予 P4 和 P2 荧光探针。

#### REFERENCES

- ZHOU Q, ZHANG L, YANG T H, et al. Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy[J]. Int J Nanomedicine, 2018(13): 2921-2942.
- [2] QIU L Z, WANG X Y, CAO C X, et al. Preparation and characterization of TPGS modified carboxymethyl chitosan-Rhein polymeric micelles[J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2019, 36(4): 300-307, 380.
- [3] OUYANG H Z, QIU L Z, WANG X Y, et al. Preparation and preliminary evaluation of paclitaxel-loaded TPGS-CR polymeric micelles[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2020, 55(7): 534-541.
- [4] HAN L F, OUYANG H Z, QIU L Z, et al. Preparation and cytotoxicity evaluation of doxorubicin-loaded rhein conjugate micelles[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(16): 1921-1925.
- [5] KANG H, RHO S, STILES W R, et al. Size-dependent EPR effect of polymeric nanoparticles on tumor targeting[J]. Adv Healthc Mater, 2020, 9(1): e1901223.
- [6] WAN Z Y, ZHENG R H, MOHARIL P, et al. Polymeric micelles in cancer immunotherapy[J]. Molecules, 2021, 26(5):

1220.

- [7] SHI L W, ZHANG J Q, ZHAO M, et al. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery[J]. Nanoscale, 2021, 13(24): 10748-10764.
- [8] YANG Q, LAI S K. Engineering well-characterized PEGoated nanoparticles for elucidating biological barriers to drug delivery[J]. Methods Mol Biol, 2017(1530): 125-137.
- [9] DING J X, GUO Y H. Recent advances in chitosan and its derivatives in cancer treatment[J]. Front Pharmacol, 2022(13): 888740.
- [10] BHAVSAR C, MOMIN M, GHARAT S, et al. Functionalized and graft copolymers of chitosan and its pharmaceutical applications[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2017, 14(10): 1189-1204.
- [11] CHENG L, CHEN Q H, PI R B, et al. A research update on the therapeutic potential of Rhein and its derivatives[J]. Eur J Pharmacol, 2021(899): 173908.
- [12] HAN N N, LI X, TAO L, et al. Doxorubicin and Rhein loaded nanomicelles attenuates multidrug resistance in human ovarian cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498(1): 178-185.
- [13] WANG X Y, GUO Y L, QIU L Z, et al. Preparation and evaluation of carboxymethyl chitosan-Rhein polymeric micelles with synergistic antitumor effect for oral delivery of paclitaxel[J]. Carbohydr Polym, 2019(206): 121-131.

- [14] WANG X Y, QIU L Z, LI Q Z, et al. Synthesis of PEGylated carboxymethyl chitosan-Rhein conjugate and preparation of paclitaxel-loaded polymeric micelles[J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2018, 49(5): 596-602.
- [15] WANG W H, HUANG Z W, XUE K, et al. Development of aggregation-caused quenching probe-loaded pressurized metered-dose inhalers with fluorescence tracking potentials[J]. AAPS PharmSciTech, 2020, 21(8): 296.
- [16] QI J P, HU X W, DONG X C, et al. Towards more accurate bioimaging of drug nanocarriers: Turning aggregation-caused quenching into a useful tool[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2019(143): 206-225.
- [17] WANG X Y, WANG X Y, QIU L Z, et al. Cytotoxicity and cellular uptake of paclitaxel-loaded carboxymethyl chitosan-Rhein polymeric micelles in MCF-7 cells[J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2020, 51(1): 33-37.
- [18] WANG X Y, QIU L Z, WANG X Y, et al. Evaluation of intestinal permeation enhancement with carboxymethyl chitosan-Rhein polymeric micelles for oral delivery of paclitaxel[J]. Int J Pharm, 2020(573): 118840.
- [19] ZHANG F M, LI K X, YU Z S, et al. *In vivo* imaging of a Nile red-labeled nanoemulsion in tumor-bearing nude mice[J]. Acta Lab Anim Sci Sin(中国实验动物学报), 2019, 27(1): 91-95.

收稿日期: 2022-09-26 (本文责编: 李艳芳)