

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.04.003

LHRHa 靶向紫杉醇脂质体的制备及体外抗肿瘤作用

陈 佳¹, 孙江川¹, 常淑芳¹, 朱 轶¹, 朱深银²

(1. 重庆医科大学附属第二医院妇产科, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学附属第一医院药剂科, 重庆 400016)

【摘要】目的: 制备促黄体激素释放激素类似物(Luteinizing hormone-releasing hormone analogues, LHRHa)靶向紫杉醇脂质体(Paclitaxel liposomes, PTX-Lipo), 研究其在体外增强紫杉醇(Paclitaxel, PTX)对卵巢癌 A2780/DDP 细胞的抑制作用。方法: 采用薄膜超声法制备 PTX-Lipo 与 LHRHa 靶向紫杉醇脂质体(LHRHa-Paclitaxel liposomes, LHRHa-PTX-Lipo), 用透射电镜考察脂质体形态; 高效液相色谱法测定 2 种 PTX-Lipo 的包封率; 激光共聚焦法通过卵巢癌 A2780/DDP 细胞对 4-氟-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑荧光素的摄取检测来反映细胞对 NBD-Lipo 与 NBD-LHRHa-Lipo 的摄取情况; MTT 法及细胞克隆形成实验检测 LHRHa-PTX-Lipo 体外对卵巢癌细胞的生长抑制情况。结果: 制备 LHRHa-PTX-Lipo 的平均粒径 123.4 nm, 包封率在 90% 以上; A2780/DDP 细胞对 NBD-LHRHa-Lipo 组的荧光摄取明显高于 NBD-Lipo 组; LHRHa-PTX-Lipo 对 A2780/DDP 细胞的生长及克隆形成抑制明显高于 PTX 组及 PTX-Lipo 组($P < 0.05$)。结论: 采用薄膜超声法制备的 LHRHa-PTX-Lipo 可使药物在靶部位聚集, 增强药物对卵巢癌细胞的抑制作用。

【关键词】脂质体; 紫杉醇; 靶向递送; 促黄体激素释放激素类似物; 生物素亲和素系统; 卵巢癌

【中国图书分类法分类号】R737.31

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-25

Preparation of LHRHa-Paclitaxel liposomes and its anti-tumor effect in vitro

CHEN Jia¹, SUN Jiangchuan¹, CHANG Shufang¹, ZHU Yi¹, ZHU Shenying²

(1. Department of Obstetric and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective:* To prepare LHRHa-Paclitaxel liposomes and to observe its inhibitory effect on ovarian cancer A2780/DDP cells in vitro. *Methods:* Paclitaxel liposomes (PTX-Lipo) and LHRHa-Paclitaxel liposomes (LHRHa-PTX-Lipo) were prepared by means of film ultrasound and their morphology was examined with transmission electron microscope. The encapsulation rates of PTX-Lipo and LHRHa-PTX-Lipo were quantified with high-performance liquid chromatography (HPLC). The cellular intake of NBD-Lipo and LHRHa-NBD-Lipo was embodied through detecting the intake of NBD fluorescein by ovarian cancer A2780/DDP cells with laser confocal microscope. The inhibitory effect of LHRHa-PTX-Lipo on ovarian cancer cells in vitro was measured by MTT assay and colony-forming assay. *Results:* The mean diameter of LHRHa-PTX-Lipo particles was 123.4 nm with encapsulation rate being above 90%. The fluorescein intake of A2780/DDP cells was higher in NBD-LHRHa-Lipo group compared with that in NBD-Lipo group. The inhibitory effect of LHRHa-PTX-Lipo on the growth and clone formation of A2780/DDP cell was much more intense than that of PTX and PTX-Lipo ($P < 0.05$). *Conclusion:* LHRHa-PTX-Lipo prepared by means of film ultrasound could aggregate drugs at targeted site thus increase the inhibitory effect of drugs on ovarian cancer cells in vitro.

【Key words】liposome; Paclitaxel; targeted delivery; Luteinizing hormone-releasing hormone analogues (LHRHa); biotin-avidin system; ovarian cancer

卵巢癌具有高侵袭高转移特点, 紫杉醇(Paclitaxel, PTX)是治疗卵巢癌的强效抗癌药, 其作用原理是

在细胞增殖的 G₂ 晚期及 M 期, 稳定微管, 引起有丝分裂阻滞, 诱导细胞凋亡, 具有较强的抗癌活性^[1]。

脂质体(Liposomes, Lipo)是近年来研究比较广泛的微粒递药系统, 相对于众多递药载体而言, 对脂溶性及水溶性药物有较高的包封率的 Lipo 制备技术较成熟。紫杉醇脂质体(Paclitaxel liposomes, PTX-Lipo)的临床运用解决了 PTX 注射液存在的难溶解、血液毒性、低耐受性、溶媒毒性等不利后果^[2], 为改

作者介绍:陈 佳(1984-), 女, 硕士,

研究方向:肿瘤的靶向治疗。

通信作者:常淑芳, 女, 教授, Email:shfch2005@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30801228); 重庆市自然

科学基金资助项目(编号:CSTC, 2008BB5405); 重庆市卫生

局资助项目(编号:07-2-098, 2011-1-39)。

变给药的途径以及用药方案提供了可能性。

病变部位有更高的药物浓度以及非病变部位的毒性反应减少是国内外靶向研究方向。药物的靶向递送成为肿瘤治疗的研究热点^[3,4]。Peter Völker's 等^[5]报道 70% 的卵巢癌细胞表面过度表达促黄体激素释放激素 (Luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH) 受体。目前国内外已有相关研究用 LHRH 配体修饰微粒, 制备成肿瘤细胞靶向递药微粒, 使微粒在肿瘤部位靶向性聚集^[6], 提高靶向目标的药物浓度、生物利用度及疗效, 降低药物在非靶脏器的聚集以及毒副作用^[7]。由于载药系统的稳定性和载药量限制, 靶向治疗效果不甚理想。

国内外初步实验研究通过生物素-亲和素桥接的方式在脂质微泡上成功地实现了其与配体的稳固连接^[8]。但 Lipo 与配体的生物素-亲和素连接尚无研究报道。本研究拟通过 Lipo 高载药量和连接系统的稳定性, 实现本传递系统的靶向治疗效果。实验采用生物素-亲和素-生物素 (Biotin-Streptavidin-Biotin, BSB) 桥接技术构建 LHRH 类似物 (LHRH analogues, LHRHa) 靶向的紫杉醇脂质体 (LHRHa-Paclitaxel Liposomes, LHRHa-PTX-Lipo), 并研究其靶向性, 同时探讨细胞对 LHRHa-PTX-Lipo 的摄取以及靶向 Lipo 在体外对卵巢癌 A2780/DDP 细胞生长活性的抑制作用, 为进一步研究卵巢癌诊治中 LHRHa 导向的靶向药物递送系统奠定工作基础。

1 资料与方法

1.1 材料与仪器

卵巢癌 A2780/DDP 细胞 (华中科技大学同济医学院协和医院王泽华教授馈赠); 链霉亲和素 (Streptavidin, SA) (北京博奥森生物技术有限公司); 生物素化 (LHRHa) 序 pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-leu-leu-Arg-Pro-NH2 (北京中科亚光生物科技有限公司), PTX 原料药 (成都元成生物公司); 大豆卵磷脂 (SPC, Lipoid, 德国); 生物素化聚乙二醇二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (Bio-PEG-DSPE, Avanti, 美国); NBD-胆固醇, 胆固醇 (Sigma, 美国); RE-52A 旋转蒸发仪 (上海亚荣仪器厂); Zemsizer3000HS 激光衍射粒度分析仪 (英国马尔文公司); 日立 H-7500 透射电镜仪 (日本); TCS-SP2 激光共聚焦显微镜 (Leica, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 卵巢癌 A2780/DDP 细胞培养 卵巢癌 A2780/DDP 细胞用含 10% 灭活的小牛血清的 RPMI1640 培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养, 每 2~3 d 传代 1 次, 实验取对数生长期细胞。

1.2.2 普通脂质体及靶向脂质体制备 首先, 将 SPC 和胆固醇 (摩尔比为 90:10) 溶于氯仿, 减压旋转成膜。然后, 加入 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 使薄膜溶胀水化, 超声处理并依次过

0.45、0.22 nm 微孔滤膜, 制备得到普通 Lipo。另外, 将 SPC、胆固醇和 DSPE-PEG(2000) Biotin (摩尔比为 90:5:5) 混合后同上述方法制备得生物素化脂质体 (Bio-Lipo)。将过量 SA 加入到 Bio-Lipo 中, 4 °C 震荡反应 30 min 以生成 SA-Lipo。混悬液过 Sephadex G-100 柱除去多余的 SA (平衡及洗脱液均为 0.1 mol/L PBS, pH 5.0)。收集 SA-Lipo 加入一定量的 Bio-LHRHa, 4 °C 震荡反应 30 min, 过 Sephadex G-25 柱 (1.5 cm × 2.6 cm) 去除未结合的 LHRHa, 得 LHRHa 靶向脂质体 (LHRH-Lipo)。在原料中加入 NBD-胆固醇替代普通胆固醇分别制备荧光标记的脂质体 (NBD-Lipo) 及 LHRHa 脂质体 (NBD-LHRHa-Lipo)。

1.2.3 PTX-Lipo 及 PTX 靶向 Lipo 制备 取一定量 PTX (占总脂浓度的 30%) 与磷脂一同溶于氯仿中^[6], 同上用薄膜超声过膜法制备 PTX-Lipo 及 LHRHa-PTX-Lipo, 最终药物浓度为 0.5 mg/ml, 脂质终浓度为 10 mg/ml。连接靶向过程同上, 用 Malvern 测量仪测粒径和 Zeta 电位, 透射电镜观察并摄像。

1.2.4 PTX-Lipo 包封率及稳定性测定 将 2 种 PTX-Lipo 悬液分别加入 5% 乙醇, 给予 4 °C 下 15 000 r/min 离心 10 min 后, 加入适量乙醚, 充分混合后再于 4 °C 下以 1 000 r/min 离心 10 min, 取上层乙醚液, 氮气吹干。适量甲醇复溶。直接进行 HPLC 检测, 检测波长 227 nm。包封率 $EE(\%) = (T_{总} - F_{游})/T_{总} \times 100\%$, $T_{总}$ 为总投药量, $F_{游}$ 为游离的药量。将制备的 2 种脂质体悬液 4 °C、室温 (25 °C) 下分别静置 3、7、15 d 后, 各时间点再测定包封率, 考察其变化情况。

1.2.5 靶向 Lipo 的体外肿瘤细胞摄取研究 取常规培养的 A2780/DDP 细胞接种于 24 孔板, 37 °C, 5% CO₂ 下继续培养 48 h 后, 达 50% 融合度时, 分别加入荧光标记的靶向脂质体 (NBD-LHRHa-Lipo) 和非靶向脂质体 (NBD-Lipo), 相同条件下与 A2780/DDP 细胞共同孵育 15 min 后, PBS 洗去多余的 Lipo, 多聚甲醛固定, 激光共聚焦蓝光激发下观察细胞荧光吞噬情况。

1.2.6 PTX 靶向 Lipo 对 A2780 细胞的生长抑制作用研究 取对数生长期细胞, 接种于 96 孔板 (1×10^4 个/孔), 每组设 3 复孔, 5% CO₂ 孵箱继续培养 24 h 后, 分别加入 PTX 药物浓度为 0.01、0.1、1 μ g/ml 的 PTX 组, PTX-Lipo 组, LHRHa-PTX-Lipo 组, 另设未处理细胞、空白 Lipo, 空白靶向 Lipo 为对照组。分别共同培养 24 h 及 48 h 后, 加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μ l, 培养 4 h 后加入 150 μ l DMSO, 振摇 10 min, 置入酶标仪, 于 570 nm 处测每孔 OD 值, 计算抑制率。细胞生长抑制率 = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。存活率 = 1 - 抑制率。实验重复 3 次。

1.2.7 细胞克隆形成实验 取对数生长期细胞, 接种于 6 孔板中 (1 000 细胞/孔), 放置于孵箱 (37 °C 5% CO₂) 培养过夜后分组处理 24 h 后。每天观察细胞生长情况, 当空白对照组出现细胞克隆 (50 个以上细胞为 1 个克隆) 终止培养。固定细胞, Giemsa 染色。倒置显微镜下计数细胞克隆数, 计算克隆率: 克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数 × 100%, 克隆形成抑制率 = (对照组细胞克隆数 - 实验组细胞克隆数) / 对照组克隆数 × 100%, 实验重复 3 次。

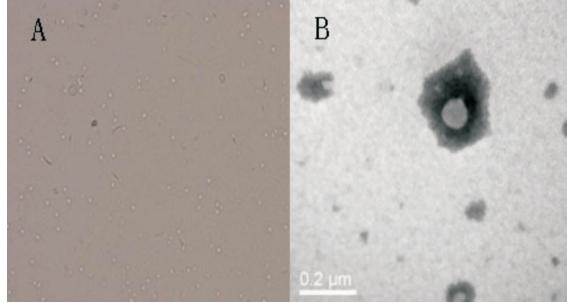
1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件对各组数据进行分析,所有数据均用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组均数的显著性检验用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 中 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 普通 PTX-Lipo 和靶向 PTX-Lipo 的特性

PTX-Lipo 与 LHRHa-PTX-Lipo 光镜下均呈大小不一的圆形,有明显的布朗运动,分散性好;透射电镜下 1% 磷钨酸负染的 LHRHa-PTX-Lipo 呈球形小体,分布比较均匀 (见图 1)。PTX-Lipo 粒径 (118.800 ± 6.804) nm; LHRHa-PTX-Lipo 粒径 (123.400 ± 8.612) nm。90% 的 Lipo 粒径分布在 200 nm 以下;连接靶向后脂质体粒径变化不大,2 种微粒分散度均较好,表面电位分别为 (-25.0 ± 2.5) mV, (-17.6 ± 1.8) mV。



A. LHRHa-PTX-Lipo 的光镜图像 (400 \times)
B. LHRHa-PTX-Lipo 透射电镜图像 (39 000 \times)

图 1 LHRHa-PTX-Lipo 的光镜及电镜透射图

Fig. 1 Light microscope and transmission electron microscope image of LHRHa-PTX-Lipo

2.2 PTX-Lipo 包封率及稳定性评价

新制备 PTX-Lipo 及 LHRHa-PTX-Lipo 包封率均大于 90%, PTX-Lipo 在 4 $^{\circ}$ C 下放置 3、7、15 d 后所测包封率分别为 89.7%、89.0%、88.1%。靶向 PTX-Lipo 在 4 $^{\circ}$ C 下放置 3、7、15 d 后所测包封率分别为 89.2%、88.4%、87.1%。连接靶向后 PTX 渗漏率不超过 4%。故制备的脂质体在 4 $^{\circ}$ C 条件下可较稳定的保存。

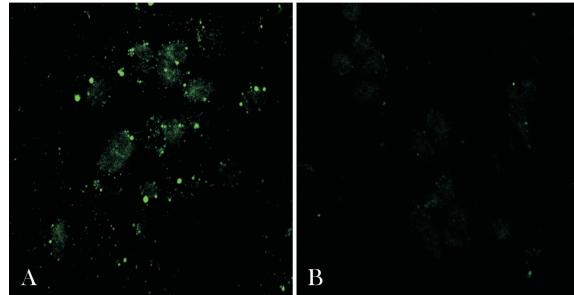
2.3 靶向 Lipo 的体外肿瘤细胞摄取研究

从图 2 可以看出细胞对普通 Lipo 及 LHRHa 靶向 Lipo 的荧光摄取情况。孵育 15 min 后,激光共聚焦显微镜下可见加入 LHRHa-NBD-Lipo 的 A2780/DDP 细胞呈现出较强的绿色荧光,同时可见细胞表面较多散在的小亮点,即 LHRHa-NBD-Lipo 粘附到细胞表面所致 (图 2A);然而加入 NBD-Lipo 的 A2780/DDP 细胞呈现出较弱的绿色荧光 (图 2B)。结果提示 A2780/DDP 细胞能更多地摄取 LHRHa-NBD-Lipo。

2.4 靶向 PTX-Lipo 对 A2780/DDP 细胞的生长抑制作用

MTT 结果显示,空白 Lipo、空白靶向 Lipo 作用肿瘤细胞后,其细胞存活率与未处理组比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。随着药物浓度从 0.01 μ g/ml 增大到 1 μ g/ml,细胞的存活率

逐渐下降。从药物与细胞作用 24 h 后对 A2780/DDP 细胞的抑制作用来看 (表 1), PTX 与 PTX-Lipo 对细胞的抑制作用差异无统计学意义 (SNK-q 统计分析 3 种浓度下分别 $P = 0.54, P = 0.73, P = 0.26$), 但 LHRHa-PTX-Lipo 对细胞的生长抑制明显高于 PTX 及 PTX-Lipo, 差别有统计学意义 (SNK-q 统计分析 3 种浓度下分别 $F = 27.75, P = 0.001; F = 12.93, P = 0.007; F = 20.16, P = 0.002$)。



A. NBD 标记的靶向 Lipo; B. NBD 标记的普通 Lipo

图 2 A2780/DDP 细胞对 NBD 标记的 LHRHa-Lipo 及 Lipo 的荧光摄取 (400 \times)

Fig. 2 Fluorescein intake of NBD marked LHRHa-Lipo and Lipo by A2780/DDP cells (400 \times)

表 1 药物作用 24 h 后不同浓度药物的各组肿瘤细胞存活率 (%)
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab. 1 Cancer cell survival rate of each group at 24 hours after administrating drugs with different dosages (%)
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	PTX 浓度 (μ g/ml)		
	0.01	0.1	1
PTX	86.02 ± 2.04	75.33 ± 1.66	65.75 ± 0.40
PTX-Lipo	87.06 ± 2.56	75.89 ± 1.83	67.25 ± 2.20
LHRHa-PTX-Lipo	76.28 ± 0.88^a	68.69 ± 2.25^a	59.98 ± 1.25^a

注:a, 作用 24 h 后, 同一药物浓度下 LHRHa-PTX-Lipo 组与 PTX、PTX-Lipo 组相比具有统计学差异, $P < 0.05$

从药物与细胞作用 48 h 后对 A2780/DDP 细胞的抑制作用看出 (表 2), PTX 与 PTX-Lipo 对细胞的抑制作用统计学差异不显著 (SNK-q 统计分析 3 种浓度下分别 $P = 0.27, P = 0.13, P = 0.84$), LHRHa-PTX-Lipo 相比其他两组统计学差异仍显著 (SNK-q 统计分析 3 种浓度下分别 $F = 29.52, P = 0.001; F = 14.98, P = 0.005; F = 6.74, P = 0.03$)。

表 2 药物作用 48 h 后不同浓度药物的各组肿瘤细胞存活率 (%)
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab. 2 Cancer cell survival rate of each group at 48 hours after administrating drugs with different dosages (%)
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	PTX 浓度 (μ g/ml)		
	0.01	0.1	1
PTX	71.87 ± 1.58	62.50 ± 0.64	47.65 ± 2.40
PTX-Lipo	70.37 ± 0.82	61.26 ± 1.10	46.87 ± 3.50
LHRHa-PTX-Lipo	62.93 ± 1.96^b	58.66 ± 0.84^b	41.00 ± 0.29^b

注:b, 作用 48 h 后, 同一药物浓度下 LHRHa-PTX-Lipo 组与 PTX、PTX-Lipo 组相比具有统计学差异, $P < 0.05$

2.5 靶向 PTX-Lipo 对 A2780/DDP 细胞克隆形成能力的抑制作用

PTX、PTX-Lipo 和 LHRHa-PTX-Lipo 3 个处理组对 A2780/DDP 细胞的克隆形成均有抑制作用, 与对照组相比较差异均有统计学意义 ($F = 294.65, P < 0.001$); 其中 LHRHa-PTX-Lipo 组克隆数较 PTX 及 PTX-Lipo 组明显有差异 ($F = 294.65, P < 0.001$)。LHRHa-PTX-Lipo 组对肿瘤细胞克隆抑制率达 56.83% (见表 3)。

表 3 各处理组细胞克隆形成的抑制情况

Tab. 3 Inhibition of cell clone in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	克隆数	抑制率(%)
A 对照组	278 \pm 7.35	-
B PTX	186 \pm 5.29 [△]	33.09
C PTX-Lipo	192 \pm 6.98 [△]	30.94
D LHRHa-PTX-Lipo	120 \pm 6.35 ^{△★}	56.83

SNK 检验, [△]: 与对照组比较 $P < 0.05$; [★]: B 组与 D 组相比, C 组与 D 组相比, $P < 0.05$

3 讨 论

目前靶向药物的制备主要有以下 4 个方法: ① 将靶部位共价连接到药物^[9]; ② 靶部位与药物递送载体共价连接^[10]; ③ 靶部位静电吸附到药物递送载体^[7]; ④ 生物素-亲和素桥接的非共价结合。对载药 Lipo 而言, 在 Lipo 表面上进行配体的修饰比较容易操作, 又不会存在直接对药物进行配体修饰可能会影响其生物学活性的情况。共价结合法一对一的连接使靶细胞连接的 Lipo 数目有限, 静电吸附法连接的稳定性评估较困难; 而生物素-亲和素桥接系统能够牢固耦联配体分子而不影响其生物学活性, 也容易与多种标记物稳定结合, 并且有很好的信号放大作用的特性, 因此选择了用生物素-亲和素系统连接配体分子和 Lipo 而制备 LHRHa-PTX-Lipo, 90% 的 Lipo 粒径分布在 200 nm 以下。粒径越小的 Lipo, 就越能逃避网状内皮系统的捕获, 在体内循环中才能有效到达靶部位。本研究制备的 Lipo 可以为以后体内的靶向研究提供基础。

在细胞摄取 Lipo 的试验中, 同非靶向 Lipo 相比, LHRHa-Lipo 很明显地被靶细胞摄取, 提示 LHRHa 与 LHRH 受体的结合介导了 LHRHa-Lipo 在靶细胞的聚集, 从而提高了细胞对 LHRHa-Lipo 内吞与摄取。

采用 MTT 法和平板克隆形成法检测了 A2780/DDP 细胞体外生长及细胞克隆形成的抑制作用。结果表明, 3 种处理因素对 A2780/DDP 细胞体外生长及单细胞克隆形成均有抑制作用, 其中靶向 PTX-Lipo 的抑制作用最强。提示除了受体介导的细胞内

吞作用增加了药物的摄取外, LHRH-PTX-Lipo 能够较早的定位于肿瘤部位而被摄取可能提高了肿瘤细胞的抑制效率。Lipo 的使用减少了相同剂量游离药物所带来的血液毒性、低耐受性等副作用, Maha Saad 等^[4]对紫杉醇的不同递送系统的研究也证实了上述观点。

本试验采用生物素-亲和素非共价连接法制备的 LHRHa 配体修饰的载 PTX-Lipo 是一种很有前景的卵巢癌靶向药物递送系统。LHRHa-PTX-Lipo 更容易将 PTX 药物递送至 LHRH 受体高表达的肿瘤细胞并有效地抑制肿瘤细胞生长, 但其疗效及靶向性还需要进一步的体内实验验证。

参 考 文 献

- [1] Rowinsky E K, Donehower R C. Paclitaxel (Taxol) [J]. N. Engl. J. Med., 1995, 332(6): 1004-1014.
- [2] Immordino M L, Brusa P, Arpicco S, et al. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel [J]. J Control Release, 2003, 91(3): 417-429.
- [3] 张志荣. 靶向治疗分子基础与靶向药物设计 [M]. 北京: 科学出版社, 2006: 3-20.
- [4] Zhang Z R. Molecular basis of targeted therapy and targeted drug design [M]. Beijing: Science Press, 2006: 3-20.
- [5] Saad M, Garbuzenko O B, Ber E, et al. Receptor targeted polymers, dendrimers, liposomes; which nanocarrier is the most efficient for tumor-specific treatment and imaging [J]. Control Release, 2008, 130(2): 107-114.
- [6] Völker P, Gründker C, Schmidt O, et al. Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: frequency, autoregulation, and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone-releasing hormone analogues [J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 186(2): 171-179.
- [7] Minko T, Patil M L, Zhang M, et al. LHRH-Targeted nanoparticles for cancer therapeutics [J]. Methods Mol Biol, 2010, 624(281): 281-294.
- [8] Qin Y, Song Q G, Zhang Z R, et al. Ovarian tumor targeting of docetaxel-loaded liposomes mediated by Luteinizing hormone-releasing hormone analogues. In vivo distribution in nude mice [J]. Arzneimittelforschung, 2008, 58(10): 529-534.
- [9] 李颖嘉, 何洁, 孙学刚, 等. 生物素-亲和素介导以 KDR 为靶点的脂质体超声造影剂体外靶向实验研究 [J]. 中华超声影像学杂志, 2010, 19(5): 446-450.
- [10] Li Y J, He J, Sun X G, et al. Preparation of biotin-avidin mediated KDR-targeted liposome ultrasound contrast agent and targeted experiment in vitro [J]. Chin J Ultrasonogr, 2010, 19(5): 446-450.
- [11] Sundaram S, Durairaj C, Kadam R, et al. Luteinizing hormone-releasing hormone receptor-targeted deslorelin-docetaxel conjugate enhances efficacy of docetaxel in prostate cancer therapy [J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(6): 1655-1665.
- [12] He Y N, Zhang L H, Song C X. Luteinizing hormone-releasing hormone receptor-mediated delivery of mitoxantrone using LHRH analogs modified with PEGylated liposomes [J]. International Journal of Nanomedicine, 2010, 5: 697-705.

(责任编辑:冉明会)