文章编号: 1673-1689(2011)04-0489-06

过氧化氢酶固体脂质纳米粒的制备

陈 焱[1], 黄健花[1,2], 蔡春明[3], 王兴国*[1,2]
(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 3. 江苏省油脂产品质量监督检验中心, 江苏 张家港 215600)

摘 要: 通过 W/O/W 两步乳化技术和乳化-溶剂挥发法制备装载亲水性大分子的固体脂质纳米粒。结果表明: 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)是一种有效的乳化剂, 其浓度对粒子的大小、电位有一定影响。乳化工艺为第一步乳化超声 20 s 和第二步乳化超声 30 s, 选用二氯甲烷-丙酮作为有机溶剂, 乳化剂 PLGA 的添加量为 15%, 此时包封率达到 58.75%, 得到的粒子形态均一、分布均匀; 体外释放试验表明: 释药性能符合长效制剂特征, 且释放后的酶结构并未遭到严重破坏。

关键词: 固体脂质纳米粒; 过氧化氢酶; 包埋
中图分类号: Q 554 文献标识码: A

Preparation of Catalase-Loaded Solid Lipid Nanoparticles

CHEN Yan[1], HUANG Jian-hua[1,2], CAI Chun-ming[3], WANG Xing-guo*[1,2]
(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Province Center of Supervision & Inspection on Oil and Fat Product Quality, Zhangjiagang 215600, China)

Abstract: The aim of this manuscript is to prepare the catalase-loaded solid lipid nanoparticles using the W/O/W double emulsion and solvent evaporation techniques. The results showed that PLGA was an efficient emulsifier for the preparation, the concentration of PLGA had an effect on the particle size and zeta potential. From the results we can conclude that the sonication time for the W/O emulsion was 20 s, the sonication time for the W/O/W double emulsion was 30s, Methylene chloride/acetone (1/1) was selected as the organic solvent, the concentration of PLGA was 15%, and the encapsulation efficiency was achieved at 58.75%, also we got the homogeneous particles. The vitro release results showed Higuchi equation could apply to this release curves. This results presented here indicated that the carrier can prolong the action time of the catalase. The CAT structure also was not damaged during this process through determining the activity.

Key words: solid lipid nanoparticles, catalase, entrapment

过氧化氢酶[1](Catalase, CAT), 是目前了解的抗活性氧生物活性物质之一, 是一种酶类清除剂, 又称

收稿日期: 2010-06-25
基金项目: 国家 863 计划项目(2009AA101505)。
* 通讯作者: 王兴国(1962-), 男, 浙江台州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事油脂深加工研究。
Email: oileag@jiangnan.edu.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

触酶, 是以铁卟啉为辅基的结合酶。它可促使 H_2O_2 分解为氧分子和水, 清除体内的过氧化氢, 从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害, 是生物防御体系的关键酶之一。然而该酶具有活性半衰期短、稳定性差、易被酶降解及口服难以吸收等缺点, 因此需对其进行适当处理改善上述问题, 其中, 固载是常见且有效的手段之一[2], 采用一种载体将其装载, 使其在体内的性质取决于载体而不是过氧化氢酶本身。

固体脂质纳米粒(SLN)[3] 是由固态脂类为原料制备得到的纳米粒子, 它采用生理相容、耐受性好的类脂材料为载体, 同时这种固体基质又可达到控制药物释放的目的, 避免药物的降解或泄漏, 并具有良好的给药靶向性等特点, 被广泛用于大分子药物如基因、多肽等, 及小分子药物如抗癌新药托氟啶和抗风湿药物阿克他利等[3]。因此, 将过氧化氢酶制备成固体脂质纳米粒, 可以控制过氧化氢酶的释放, 延长 CAT 的抗氧化作用时间。但是就过氧化氢酶制备固体脂质纳米粒方面, 目前国内尚未见报道。

过氧化氢酶是亲水性的大分子, 很难包封于具有疏水性基质的 SLN 中, 鉴于此, 作者选用三棕榈酸甘油酯作为固脂基质, 选用聚乳酸- 羟基乙酸共聚物(PLGA) 作为乳化剂, 通过 W/O/W 两步乳化技术和乳化-溶剂挥发法制备过氧化氢酶固体脂质纳米粒[4]。W/O/W 两步乳化技术和乳化-溶剂挥发法可有效制备蛋白类大分子装载的固体脂质纳米粒, 也是目前国内外脂质体研究领域的热点之一。过氧化氢酶固体脂质纳米粒制备见图 1。

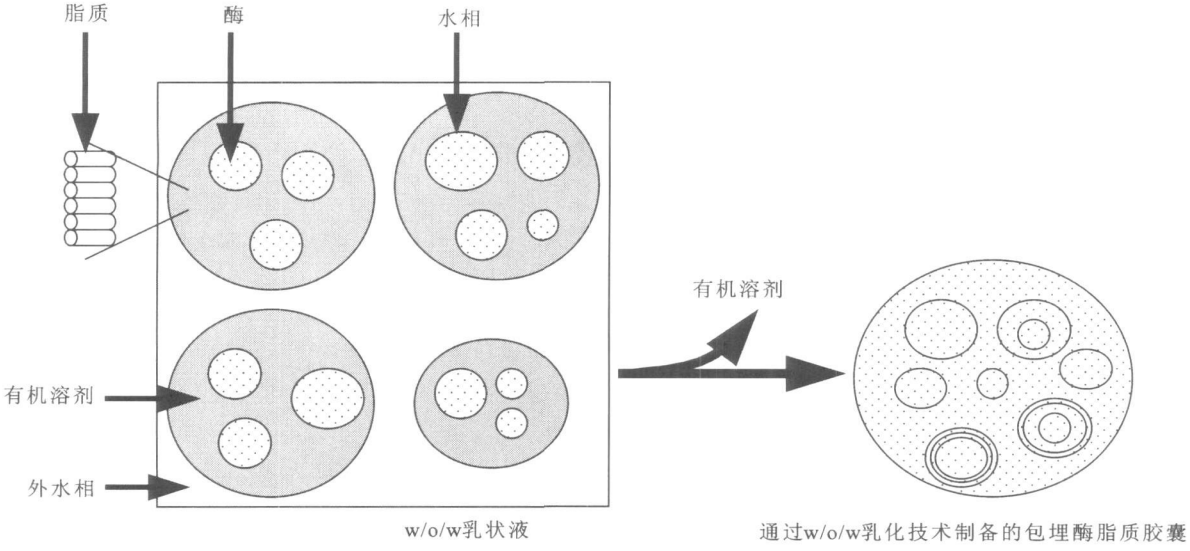


图 1 包埋酶脂质胶囊的制备

Fig. 1 Schematic summary of the method that used for the preparation of enzyme-containing lipid vesicles

采用 W/O/W 两步乳化技术和乳化-溶剂挥发法制备了过氧化氢酶固体脂质纳米粒, 由于第一步乳化对制备效果的影响最大, 实验过程考察了在制备过程中有机溶剂和乳化方式对酶活的影响; 第一步乳化乳化剂用量对乳状液稳定性的影响; 第二步乳化剂用量对包封率和粒子粒径、电位的影响, 并观察了粒子形态。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 主要材料、试剂 过氧化氢酶: 上海楷洋生物技术有限公司产品; CAT 测试盒: 南京建成生物工程研究所产品; PLGA (50: 50), 山东医疗器械研究所产品; 三棕榈酸甘三酯, 实验室自制; 二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮: 均为分析纯试剂。

1.1.2 主要实验仪器 RE-52A 旋转蒸发仪: 上海市亚荣生化仪器厂产品; 数显恒温水浴锅: 江苏省金坛市荣华仪器公司产品; 日立高速冷冻离心机: HITACHI 日本日立公司产品; 超声波细胞破碎仪: 上海之信仪器有限公司产品; UV-2100 紫外分光光度计: 尤尼柯(上海) 仪器有限公司产品; 纳米粒度及 ZETA 电位分析仪: 英国马尔文仪器有限公司产品; 透射电镜, 日本日立公司产品; 荧光光谱仪 F-7000, HITACHI 日本日立公司产品。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　试验方法

1.2.1　两步乳化法 W/O/W 制备过氧化氢酶固体脂质纳米粒

1) 有机溶剂的筛选　将 8.0 mg(565 U·min^{-1}·mg^{-1})的酶溶液溶于 400 μL pH 7.0 PBS 缓冲液中,取 0.20 mL 的酶溶液于 1 mL 有机溶剂(二氯甲烷、乙酸乙酯、二氯甲烷-丙酮)中,超声波处理(或漩涡震荡)10 s;再加入至 2.0 mL 的 pH 7.0 PBS 缓冲液中,超声波处理(或漩涡震荡)10 s;旋转蒸发法除去有机溶剂,测定酶活。

2) 处理方式和时间的选择　将 8.0 mg(565 U·min^{-1}·mg^{-1})的酶溶液溶于 400 μL pH 7.0 PBS 缓冲液中,超声波处理(或漩涡震荡)不同时间;0.20 mL 的酶溶液加入到 2.0 mL pH 7.0 的 PBS 缓冲液中超声波处理不同时间。

3) 试剂盒测定酶活　加入钼酸铵而迅速终止过氧化氢酶(CAT)分解 H_2O_2 的反应,剩余的 H_2O_2 与钼酸铵作用产生一种淡黄色的络合物,在 405 nm 处测定其生成量。定义每毫克酶每秒钟分解 1 μmol H_2O_2 的量为一个活力单位。

4) 过氧化氢酶固体脂质纳米粒的制备　将 200 μL 质量浓度为 20 mg/mL 的酶溶液加入至 1.0 ml 溶有 100 mg 三棕榈酸甘三酯和不同含量 PLGA 的有机溶剂超声乳化形成 W/O 乳状液,得到的乳状液加入到 5.0 mL 质量分数 2% 的 Poloxmer188 溶液中,采用同样的方法超声形成 W/O/W 型乳状液。所得双乳液抽真空旋转蒸发、冷冻离心(15 000 r/min, 60 min, 4 ℃)得到纳米粒。空白样采用 200 μL 的去离子水代替酶溶液同法制备。

1.2.2　初始形成的 W/O 乳状液稳定性的检测　考察不同浓度的 PLGA 对乳化稳定性的影响(PLGA/三棕榈酸甘三酯),乳化稳定性通过测定乳状液的稳定时间而得到,即形成的不透明的乳状液的稳定时间,乳状液随着时间的延长会产生相分离。

1.2.3　包封率的测定　考马斯亮蓝法间接测定蛋白质质量,测定酶溶液和离心后上清液的蛋白质质量,根据下式计算包封率:

$$\text{包封率}(\%)=\frac{(\text{原料中蛋白质质量}-\text{上清液中蛋白质质量})}{\text{原料中蛋白质质量}}\times 100\%$$

蛋白质标准曲线的制作　取 6 支 10 mL 干净的具塞试管,加入不同质量浓度(0、20、40、60、80、100 μg/mL)的标准白蛋白质溶液 1 mL 后,加入 5 mL 考马斯亮蓝溶液显色。盖塞后,将各试管中溶液纵向倒转混合,放置 2 min 后用 1 cm 光径的比色杯在 595 nm 波长下比色,记录各管测定的光密度 $A_{595\,nm}$,以 A 值为纵坐标、蛋白质质量浓度作为横坐标制作标准曲线(见图 2)。回归方程: $y=0.007\,5x+0.018\,2$, $r=0.996\,9$; 线性范围: 0~100 μg/mL。

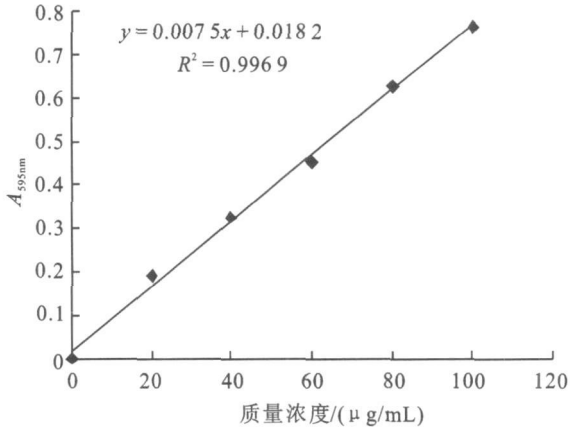


图 2　蛋白质质量浓度标准曲线

Fig. 2　Standard curve of the protein content

1.2.4　粒径和电位的测定　将冷冻离心得到的纳米粒稀释至一定浓度用仪器测定。

1.2.5　粒子的形态学观察　过氧化氢酶固体脂质纳米粒的的形态学通过 TEM 观察,100 μg 的样品溶于 1 mL 去离子水中,取 2 μL 置于铜网上干燥后用于观察其形态。

1.2.6　体外释放检测　将冷冻离心得到的纳米粒置于离心管中,加入 pH 6.8 的 PBS1.0 mL 作为释放介质,于恒温摇床中,在 37 ℃、100 r/min 的条件下进行释放试验。定时取样 0.2 mL 离心,并补加等量的新鲜 PBS 液,继续振荡。所取上清液用考马斯亮蓝法测定其蛋白含量,以 PBS 液为空白对照,根据标准曲线计算累积释药百分率。

1.2.7　释放前后酶活测定及其二级结构测定　由于纳米粒子会产生严重的光散射现象,严重干扰测量结果,所以在 SLN 相中的蛋白质的二级结构用圆二色的方法测定较为困难。故将释放后的过氧化氢酶与原样对比,考察其在制备过程中二级结构的变化;由于乳化剂的存在在测定酶活时会干扰其吸光值,故将释放后的酶进行活力测定。

2　结果与讨论

2.1　有机溶剂对酶活的影响

在制备过程中,有机溶剂的选择非常关键,一方面需保证溶剂对甘三酯具有较好的溶解性能,利于其分散包裹酶形成 W/O;另一方面应避免溶剂导致酶的失活。鉴于上述原则,综合以往的文献报道,选择二氯甲烷[5]、乙酸乙酯、二氯甲烷-丙酮等 3 种溶剂进行比较,结果见表 1。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 有机溶剂对酶活的影响

Tab. 1 Effect of the organic solvent and the sonication time on the CAT activity

超声时间	有机溶剂	酶活力/ %
10 s+ 10 s (第二步)	乙酸乙酯	35. 16
10 s+ 10 s (第二步)	二氯甲烷	57. 62
10 s+ 10 s (第二步)	二氯甲烷/丙酮(1/1)	62. 28
漩涡震荡+ 10 s (第二步)	乙酸乙酯	42. 36
漩涡震荡+ 10 s (第二步)	二氯甲烷	69. 48
漩涡震荡+ 10 s (第二步)	二氯甲烷/丙酮 (1/ 1)	73. 3

由表 1 可见, 有机溶剂对酶活的影响较大, 不同的有机溶剂会导致不同程度的酶变性失活。二氯甲烷/ 丙酮的配比对酶活的影响最小; 乙酸乙酯对酶活力的影响最大, 所以采用二氯甲烷– 丙酮作为制备过程中的有机溶剂。

2 2 超声时间对酶活的影响

超声处理和漩涡震荡都能达到乳化效果, 超声由于其超声空化效应、热效应等具有有效的乳化作用, 但同时对 CAT 有一定的破坏作用, 处理时间过长可能会导致酶的失活, 因此, 有必要考察超声处理过程对酶活的影响, 结果见表 2。

表 2 不同超声时间对酶活的影响

Tab. 2 Effect of the different sonication time on the CAT aetivity

第一步	第二步	酶活力/ %
0	0	100
超声 30 s	超声 30 s	43. 56
超声 20 s	超声 20 s	55. 68
超声 10 s	超声 10 s	61. 35
漩涡 30 s	超声 10 s	76. 26
漩涡 30 s	超声 30 s	60. 42

由表 2 可见, 第一步采用漩涡震荡比超声波处理对酶活的影响小, 尽管如此, 鉴于第一步乳化后的稳定性对包封率的影响甚大, 而超声的乳化效果(通过稳定时间观察) 较漩涡震荡好(结果中未显示) , 故不宜选择漩涡震荡作为第一步乳化的方法; 就整体而言, 超声时间的延长均会导致酶活的降低, 所以超声波处理时间不宜过长, 尤其是在进行第一步处理时, 因为此时酶处于完全暴露状态; 而第二步乳化时酶已被包封于甘三酯内部, 其受到破坏的可能性相对较小, 则可适当延长超声波处理时间。因此综合考虑乳化效果和酶的稳定性, 第一步选用 20 s 超声处理, 第二步选择 30 s 超声处理。

2 3 PLGA 质量分数对 **W/ O** 乳状液稳定性的影响

W/ O 乳状液的稳定性对 W/ O/ W 乳液的稳定有重要影响[27], 且内相乳化剂对于稳定 W/ O 乳状液起着重要作用, 故考察 PLGA 浓度对的 W/ O 乳状液的影响非常重要。W/ O 乳状液的稳定性可直接通过观察其分层时间来考察, 结果见图 3。

由图 3 可见 PLGA 质量分数对 W/ O 乳状液的稳定性有着 显著的影响。PLGA 是由乳酸和羟乙酸聚合而成的, 乳酸具有疏水性而羟乙酸具有亲水性, 由于 PLGA 具有两亲性(一部分疏水, 一部分亲水) , 因此能够降低水相和有机相的界面张力。由图可见 PLGA 浓度越高, W/ O 乳状液的稳定性越好, 这可能是由于 PLGA 质量分数越高, 在油水界面的乳化剂层越厚, 一定厚度的乳化层对于稳定脂质乳状液的空间结构是必须的。根据稳定胶体的 DLVO 理论[6], 胶粒之间存在着 Van der Waals 吸引, 而胶粒在相互靠近时又因双电层的存在而产生排斥, 胶体的稳定性就取决于这两种作用的相对大小, 胶体系统加入表面活性剂后, 粒子之间的排斥力增加从而体系的稳定性增加。综上所述, 选择乳化剂 PLGA 质量分数 15%。

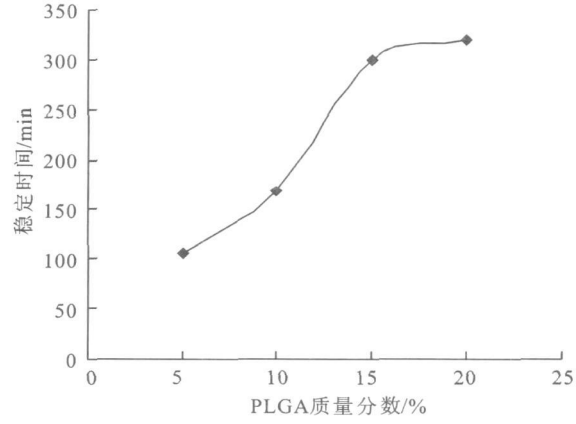


图 3 **PLGA** 质量分数与 **W/ O** 乳状液稳定时间

Fig. 3 Effect of the PLGA concentration on the stable time of the W/ O emulsion

2 4 PLGA 质量分数对包封率的影响

有研究表明乳化剂的质量分数可显著影响 SLN 的质量即包封率, 故改变 PLGA 质量分数, 考察其对过氧化氢酶包封率的影响, 结果见图 4。

由图 4 可见, 随着 PLGA 质量分数的提高, 包封率有所上升, 在其质量分数为 15% 时达到最大值, 之后随着质量分数的上升, 包封率又有所下降。高质量分数的第一步乳化剂能够降低水相和有机

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

相的界面张力[6], 增加了酶和脂质相互接触的可能性, 从而使包封率提高, 同时第一步乳化得到的稳定的 W/ O 乳状液对于通过两步乳化法得到的 W/ O/ W 乳状液的包封率有着重要影响; 在质量分数达到 20% 时包封率又有所下降的原因可能是与外水相的浓度差加大导致跨膜运输更容易。综上所述, 选择选择乳化剂 PLGA 质量分数为 15% 。

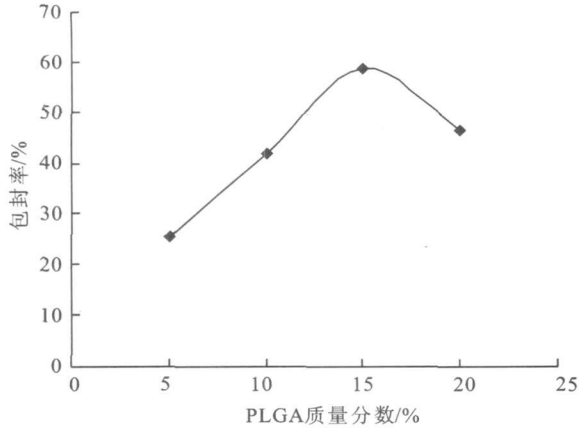


图 4　PLGA 质量分数对包封率的影响

Fig. 4　Effect of the PLGA concentration on the efficiency

2 5　PLGA 质量分数对粒径、电位的影响

PLGA 质量分数对粒径、电位均有一定影响, 测得结果见表 3。

表 3　PLGA 质量分数对粒子粒径和电位的影响

Tab. 3　Effect of the PLGA concentration on the particle size and zeta potential

PLGA 质量分数/ %	平均粒径/ nm	电位/ mV	多分散性
5	267. 7	- 22. 0	0. 308
10	249. 2	- 23. 5	0. 327
15	250. 9	- 26. 5	0. 279
20	255. 5	- 27. 0	0. 310

由表 3 可见, PLGA 质量分数对粒径影响不大, 得到粒子粒径均在 240~ 270 nm 之间; 随着 PLGA 质量分数的提高, 粒子的电位会降低, 这可能是由于 PLGA 是带负电的, 有一部分会存在于粒子的表面, 从而使电位降低, 粒子电位值越小, 粒子间斥力增加, 粒子越稳定。综合以上分析, 综合考虑选择 PLGA 质量分数为 15%。

2 6　粒子的形态学观察

按照优化工艺条件制备的过氧化氢酶-PL GA 纳米粒通过透射电镜观察, 得到下图 5。

由图 5 可见纳米粒呈球形, 且形态均一、分布均匀, 并能看出酶已被包载上, 但是这个观测到的粒径和上面直接测得的不太一致, 这可能是因为通过纳米粒度及 ZETA 电位分析仪测得的是含水的粒径, 但是通过电镜观察的是没有自由水, 甚至一部分结合水都失去的粒子粒径, 因此测得的这个粒径会小于粒度仪测得的粒径。

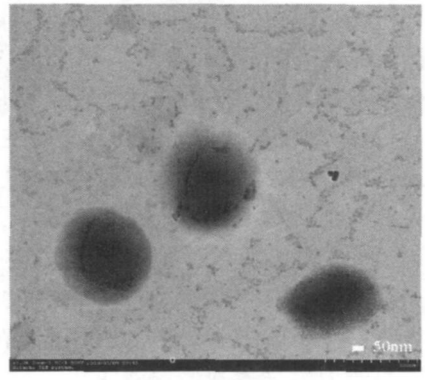


图 5　过氧化氢酶固体脂质纳米粒的的形态学

Fig. 5　The morlhology of CAT-loaded SLN

2 7　体外释放性能

按照优化工艺条件制备的 catalase-PL GA 纳米粒 24 h 内体外释放曲线见图 6。

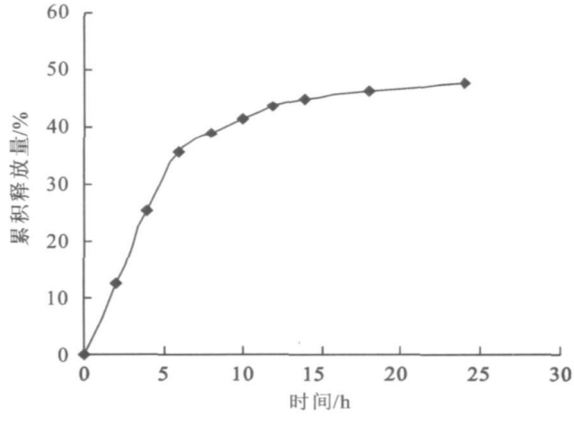


图 6　过氧化氢酶固体脂质纳米粒的体外释放曲钱

Fig. 6　Vitro release curve of CAT-loaded solid lipid nanoparticles

由上图可见, 载过氧化氢酶的固体脂质纳米粒体外释放行为表现为初期的快速释放和后期的缓慢释放两种状态, 前 8 h 有突释现象, 而后开始缓慢释放, 24 h 释放量为 47% 。对其进行拟合近似于 Higuchi 方程。该方程为 $y = 9.617\ t^{1/2} - 0.067\ 78$ ($R^2 = 0.944\ 2$), 说明过氧化氢酶固体脂质纳米粒体外释药性能符合长效制剂特征。

2 8　释放后过氧化氢酶与原过氧化氢酶的远紫外-圆二色光谱及酶活力测定

过氧化氢酶的二级结构可通过远紫外-圆二色光谱仪测定, 为考察制备过程中酶结构的变化, 测定释放后过氧化氢酶与原过氧化氢酶的远紫外-圆二色光谱以观察其二级结构的改变, 测得在 208 nm

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

和 218 nm 处为 α-螺旋的特征峰; 215 nm 是 β-折叠的特征峰。表 4 分别列出了过氧化氢酶原样和释放出来的过氧化氢酶的二级结构形式的百分比。通过对比发现, 过氧化氢酶中 α-螺旋的含量基本不变; 而 β-折叠的含量有所差别, 释放出来的 β-折叠含量明显比在原样含量低; 而且释放出来的 β-转角含量比原样含量高。由于 β-折叠和 β-转角都是由氢键构成, 这里可能存在着 β-折叠向 β-转角转变的过程, 因而导致 β-折叠的含量降低。由此可见, 过氧化氢酶的二级结构仅仅是受到轻微的扰动, 并没有遭到破坏, 其二级结构仍然较好地保持着; 且对释放后的酶溶液进行活力测定, 其活力为原样酶活力的 62.35%(352 U·min^{-1}·mg^{-1}), 由此可知在整个制备过程中酶活力并未遭到严重破坏。

表 4 过氧化氢酶二级结构的质量分数

Tab. 4 Percentages of CAT secondary structures

过氧化氢酶二级结构	原样品中二级结构/%	释放后样品中二级结构/%
α-螺旋	48.6	43.2
β-折叠	32.5	20.8
β-转角	3.6	13.7

3 结 语

通过以上研究发现, 通过 W/O/W 两步乳化技术和乳化-溶剂挥发法可以成功制备过氧化氢酶固体脂质纳米粒, 通过对有机溶剂、处理手段和时间等相关工艺的优化得到较理想的制取条件, 该条件下包封率达 58.75%, 同时对不同 PLGA 添加量所制得纳米脂质体的粒径、电位、形态进行了表征; 对最优条件下制备的纳米粒子进行体外释放表明释药性能符合长效制剂特征, 这为体内迅速起效并维持较长平稳的血药浓度的治疗目标, 开辟了一种制剂学的新手段。将释放后的酶溶液进行活力测定及二级结构测定表明在制备过程中酶结构并未遭到严重破坏。

以 PLGA 为乳化剂制备的载药微球和纳米粒既可提高药物的稳定性, 又能实现缓释、控释和靶向释放[7-9]的目的, 同时还具有携带药物穿过组织屏障的潜力[10], 以此为乳化剂所制得的过氧化氢酶固体脂质纳米粒相关方面的性能有待进一步研究。

参考文献(References):

[1] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 223-232.
LIU Bing, LIANG Chan-juan. Recent advances of catalase in organism[J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin,** 2005, 21(5): 223-232. (in Chinese)

[2] 王燕佳, 蒋惠亮, 任国晓等. 新型磁性纳米粒子固定脂肪酶的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(6): 1673-1689.
WANG Yan-jia, JIANG Hui-liang, FANG Yin-jun, et al. Study on the immobilization of lipase with novel magnetic nanoparticles[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2008, 27(6): 1673-1689. (in Chinese)

[3] 刘春喜, 张娜. 固体脂质纳米粒的研究及应用[J]. 食品与药品, 2009, 11(07): 57-60.
LIU Chun-xi, ZHANG Na. Study and application of solid lipid nanoparticles[J]. **Food and Drug,** 2009, 11(07): 57-60. (in Chinese)

[4] M. Garcia-Fuentes. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules[J]. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** 2002 (27): 159-168.

[5] B Gander, E Wehrl, R Alder. Quality improvement of spray-dried, protein-loaded D, L-PLA microspheres by appropriate polymer solvent selection[J]. **Microencapsulation,** 1995 (12) 83-97.

[6] XIE Shu-yu, WANG Si-liang, ZHOU Wen-zhong, et al. Effect of PLGA as a polymeric emulsifier on preparation of hydrophilic protein-loaded solid lipid nanoparticles[J]. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** 67 (2008) 199-204.

[7] Luan X, Bodmeier R. In situ forming microparticle system for controlled delivery of leuprolide acetate: Influence of the formulation and processing parameters[J]. **European Journal of Pharmaceutical Sciences,** 2006, 27(2-3): 143-149.

[8] LI Ya-ping, PEI Yuan-ying, GAO Xia-jian, et al. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats[J]. **Journal of Controlled Release,** 2001, 71(2): 203-211.

[9] Lucienne J. The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticales[J]. **Drug Discovery Today,** 2008, 13(23-24): 1099-1106.

[10] Gulyaev AE, Gelperina SE, Skidan IN et al. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles[J]. **Pharmaceutical Research,** 1999, 16(10): 1564-1569.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net