

指 导 教 师 栏	
签名即确认纸质版与电子版终稿一致。	

# 中国药科大学

# 本科毕业论文

论文题目 PTX-DCA 杂化晶体的制备与评价

英文题目 Preparation and Evaluation of PTX-DCA Cocrystals

专业 药学 (拔尖计划)

院部 药学院

学号 16401702

姓名 李羿

指导教师 尹莉芳教授、何伟副教授

课题

完成场所 中国药科大学学院实验楼 430

论文工作时间：2020 年 02 月 至 2020 年 06 月

## 承诺书

本人所呈交的学位论文是本人在导师的指导下进行研究工作取得的研究成果。据本人所知，除参考文献中列出的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出了明确说明并表示谢意。本人郑重承诺：本论文纸质版与上传学校毕业设计（论文）管理系统中的电子版终稿保持一致；如果存在剽窃行为和其他任何版权纠纷，本人将承担责任，并愿意接受学校有关学历、学位管理方面的处理，且不受时间的限制。

作者签名：

日期：2020 年 5 月 22 日

# PTX-DCA杂化晶体的制备与评价

## 目录

<b>摘要</b>	4
<b>Abstract</b>	4
<b>缩略语</b>	5
<b>仪器与试剂</b>	6
<b>前言</b>	7
<b>第一章 制备与表征</b>	9
<b>1.1 PTX-DCA Ns的制备</b>	9
1.1.1 制备方法的建立	9
1.1.2 制备条件的优化	9
1.1.2.1 超声参数的优化	9
1.1.2.2 处方比例的优化	9
1.1.2.3 载药量的优化	10
<b>1.2 PTX-DCA Ns的体外表征</b>	10
1.2.1.包封率测定	10
1.2.1.1 HPLC方法建立	10
1.2.1.2 标准曲线绘制	10
1.2.1.3 样品处理与检测	10
1.2.2 形态学表征	10
<b>1.3. 结果与讨论</b>	11
<b>第二章 晶体结构确证与体外性质考察</b>	13
<b>2.1结构确证</b>	13
2.1.1 X射线粉末衍射	13
2.1.2 荧光共振能量转移	13
2.1.3 圆二色光谱	13
<b>2.2 性质考察</b>	13
2.2.1 体外稳定性实验	14
<b>2.3 结果与讨论</b>	14
<b>第三章 细胞水平有效性考察</b>	18
<b>3.1 细胞培养和A549/Taxol耐药细胞株建立</b>	18
<b>3.2 细胞毒性实验</b>	18
<b>3.2 结果与讨论</b>	18
<b>第四章 结论与展望</b>	20
<b>参考文献</b>	21
<b>致谢</b>	23

# PTX-DCA杂化晶体的制备与评价

16401702 李羿

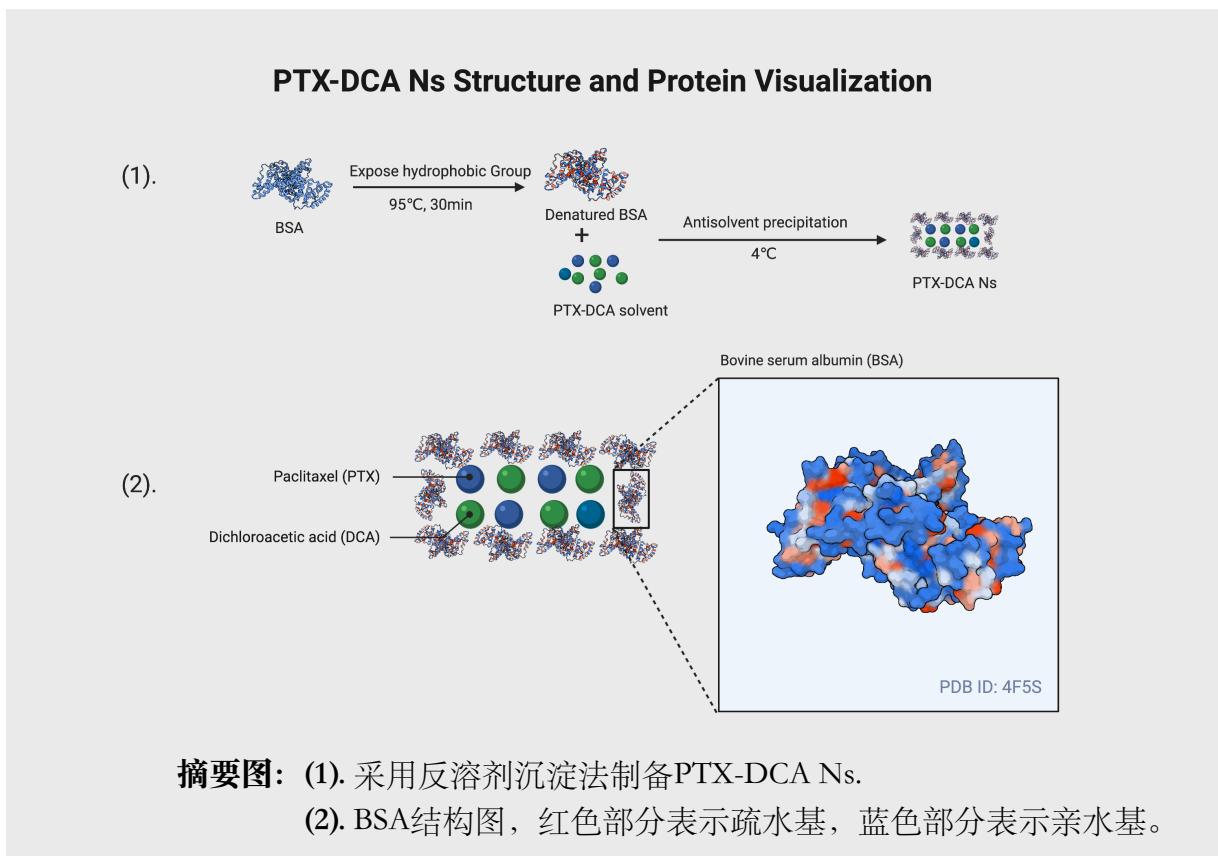
**摘要：**多药耐药性 (Multidrug resistance, MDR) 是导致非小细胞癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 化疗失败的主要原因。因此，结合抗癌药物和耐药性逆转药物的联合治疗可能是一种很有前途的转移癌治疗策略。本项目设计了紫杉醇-二氯乙酸纳米杂晶递送平台 (Paclitaxel-dichloroacetic acid nanococrystals, PTX-DCA Ns) 用于抑制应激性细胞自噬和提高化疗敏感性。PTX和DCA可在溶剂极性急剧改变的条件下发生结晶和吸附作用，在稳定剂牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 溶液中形成杂化纳米晶体。PTX作为晶体骨架可介导形态依赖性非溶酶体途径入胞，并干扰微管蛋白解聚发挥抗肿瘤作用；同时，DCA可下调MDR-1基因控制的药物外排泵，通过抑制应激性细胞自噬逆转MDR，解决PTX引起的耐药性问题，最终增强细胞毒性作用。这项研究基于药物递送药物的思路 (Drug-delivery-drug strategy, DDD) 构建了疏水性差异较大的两种药物的共递送体系，在细胞水平上验证了有效性，并为后续研究奠定基础。

**关键词：**纳米杂晶；非小细胞癌；多药耐药性；紫杉醇；二氯乙酸；药物递送系统

## Preparation and Evaluation of PTX-DCA Cocrystals

**Abstract:** Multidrug resistance (MDR) is a leading cause of chemotherapy failure in non-small cell lung cancer (NSCLC). Therefore, the combination of anticancer drugs and drug-resistance reversal drugs may be a promising approach for the treatment of metastatic cancer. In this research, paclitaxel- dichloroacetic acid nano hybrid delivery platform (PTX-DCA Ns) was designed to inhibit stress autophagy and increase chemosensitivity. PTX and DCA combine via crystallization and adsorption under the condition of sharp change of solvent polarity, and form hybrid nanocrystals in bovine serum albumin (BSA) solution. PTX, as a crystal skeleton, mediates morphological-dependent non lysosomal endocytosis and interfere with the depolymerization of tubulin to play an anti-tumor role. Meanwhile, DCA down regulates drug efflux pumps controlled by MDR-1 gene and reverse MDR by inhibiting stress autophagy, thus to solve the problem of drug resistance caused by PTX, and eventually enhance the cytotoxic effect. Based on the idea of drug-delivery-drug (DDD), we constructed a co-delivery system of two drugs with very different hydrophobicity, verified effectiveness at the cell level, and built foundation for sequential studies.

**Keywords:** nano cocrystal; NSCLC; MDR; PTX; DCA; drug delivery system



## 缩略语

英文缩写	英文全称	中文全称
PTX	Paclitaxel	紫杉醇
DCA	Dichloroacetic acid	二氯乙酸
BSA	Bovine albumin	牛血清蛋白
MDR	Multi-drug resistance	多药耐药性
NSCLC	Non-smallcelllungcancer	非小细胞肺癌
DLS	Dynamic light scattering	动态光散射
PBS	Phosphate Buffer Solution	磷酸盐缓冲溶液
EPR	Enhanced Permeability and Retention Effect	肿瘤部位的高渗透和长滞留效应
PDI	Polydispersity index	多分散系数
TEM	Transmission Electron Microscope	透射电镜
FRET	Fluorescence resonance energy transfer	荧光共振能量转移
PXRD	Powder X-ray diffraction	X-射线粉末衍射
CD	Circular dichroism	圆二色光谱

EE%	Encapsulation efficiency	包封率
A549	Sensitive human lung adenocarcinoma cell	腺癌人类肺泡基底上皮细胞

## 仪器与试剂

仪器名称	型号
FiveEasy Plus 型 pH 计	Mettler Toledo, FiveEasy Plus
ME55电子天平	Mettler Toledo
超声波细胞破碎仪	SCIENTZ- II D, 宁波新芝生物仪器有限责任公司
动态光散射纳米粒径仪	ZetaPlus, 美国布鲁克海文公司
透射电子显微镜	JEM-1230, 日本电子株式会社
高效液相色谱仪	LC-10AT, 日本岛津公司
超高速离心机	TGL-16B, 上海安亭科学实验仪器厂
LGJ-18C 压盖型冷冻干燥机	北京四环科学仪器厂有限公司
X-射线粉末衍射仪	D8 Advance, 美国布鲁克公司
荧光分光光度计	RF-5301PC,
圆二色光谱仪	J-810, 日本岛津公司

试剂	来源
BSA	Sigma
DCA	南京化学试剂股份有限公司, 中国
PTX	南京化学试剂股份有限公司, 中国
丙酮	南京化学试剂股份有限公司, 中国
甲醇	南京化学试剂股份有限公司, 中国
乙腈	南京化学试剂股份有限公司, 中国
盐酸	南京化学试剂股份有限公司, 中国
氢氧化钠	上海凌峰化学试剂有限公司, 中国
磷酸	南京化学试剂股份有限公司, 中国
DMSO (Dimethyl sulfoxide, 二甲亚砜)	上海凌峰化学试剂有限公司, 中国
FBS (Fetal bovine serum, 生理血清)	Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)
PBS (细胞用磷酸盐缓冲液)	Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)
RPMI-1640 cell culture medium	Wisent Inc. (St. Bruno, Quebec, Canada).

## 前言

非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 是发病率和死亡率增长最快，对人群健康和生命安全威胁最大的恶性肿瘤之一，具有生长分裂较慢和扩散转移相对较晚等特点<sup>[1]</sup>。NSCLC多发生于支气管中下段黏膜，早期呈缓慢扩大的结节状形态，较难通过手术切除；随病程深入发展为转移瘤，可在较短时间内扩散并引起脑转移<sup>[2]</sup>。基于NSCLC的病理学特点，早期干预已成为NSCLC治疗的有效策略。化疗是延缓NSCLC疾病发展主要方法，对原发病灶进行局部化疗可有效防止肿瘤转移<sup>[1]</sup>。2019年世界肺癌大会 (World Conference on Lung Cancer, WCLC) 报告表明约1%的早期NSCLC可通过化疗治愈，90%以上的NSCLC患者需要接受化疗治疗<sup>[3]</sup>。

多药耐药性 (Multi-drug resistance, MDR) 的发生导致化疗的成功率大大降低。MDR基因可编码多种位于细胞膜上的蛋白起药物泵作用，将进入细胞的药物泵出细胞外而使细胞产生耐药性<sup>[4]</sup>。据估计，MDR是导致90%以上的转移性癌症化疗失败的重要原因，因此逆转MDR是增加化疗敏感性的决定因素之一。P-糖蛋白 (P-gp) 是一种由MDR-1基因编码的过表达转运蛋白，可介导药物外排，使化疗药物从肿瘤细胞中流出从而抑制应激性细胞自噬。因此，下调P-gp是逆转MDR的有前途的策略之一<sup>[4]</sup>。

紫杉醇 (Paclitaxel, PTX) 可破坏微管蛋白和组成微管的微管蛋白二聚体之间的动态平衡，诱导与促进微管蛋白聚合、微管装配、防止解聚，从而使微管稳定并抑制癌细胞的有丝分裂和防止诱导细胞凋亡，进而有效阻止癌细胞的增殖，起到抗癌作用<sup>[6]</sup>。二氯乙酸 (Dichloroacetic acid, DCA) 是丙酮酸脱氢酶激酶的一种小分子抑制剂，可通过干扰癌细胞糖代谢发挥抗肿瘤作用<sup>[7]</sup>。最近研究表明，DCA具有抑制应激性细胞自噬的作用，可通过降低位于细胞膜上的药物外排泵活性抑制MDR效应<sup>[8]</sup>。

由于NSCLC早期症状不明显，在诊断时很可能已发展为转移瘤，或至少是局部晚期的，使得立即切除的可能性不大<sup>[9]</sup>。因此，化疗是治疗的基石。许多以不同组合和剂量表研究细胞毒药物的研究表明，只要至少给两种活性药物至少四个周期，大多数方案都有相似的反应率。目前的首选方案是4-6个疗程的依托泊苷和顺铂，或紫杉醇类抑制微管解聚的化疗药<sup>[10]</sup>。NSCLC化疗的有待攻克的难题是延缓肿瘤对化疗产生耐药性，这可能导致留下部分耐药细胞存活并生长成对化疗不敏感的新瘤<sup>[11]</sup>。改进现有化疗技术的要点在于避免MDR效应并增强肿瘤细胞对于化疗药物的敏感性，这使得药物联用成为改进化疗技术的新思路<sup>[12,13]</sup>。

药物递送药物平台 (Drug-delivering-drug platform, DDD) 为构建药物联用递送平台提供了新思路<sup>[13,14]</sup>。共同药物递送不仅需要研究药物协同作用，还对体系的入胞机制和生物利用度提出了要求。由于溶酶体的捕获导致药物生物利用度下降，因此非溶酶体途径成为了研究的热点<sup>[15]</sup>。有研究表明Caveolae介导的细胞内吞作用可以使更多的活性药物高效地进入靶细胞胞浆，从而成为药物细胞传递的一条高效的途径。具有一定粒径的纳米颗粒可通过小窝蛋白介导进入细胞增加生物利用度并在体内表现出增强的性能，显著延长了血液半衰期和肿瘤累积，也具有增加肿瘤渗透率和增强的EPR效应等优势<sup>[14,15,16]</sup>。该途径为实现高效的药物共递送提供了新思路。

共同递送策略的另一难点在于药物组份的水溶性差异<sup>[17]</sup>。药物纳米晶体 (NCs) 具有独特的理化性质，纳米级的粒径可显著增溶并提高生物利用度，被认为是一种很有前途的难溶性药物缓释体系。有研究表明制备的载药量大于50%，粒径在200nm左右的的NCs对转移癌有

较好的渗透作用和治疗效果，能明显降低过表达蛋白的表达和活性，并能显著抑制肺部转移和血管生成<sup>[17,18]</sup>。

纳米悬浮液是解决难溶性药物的溶解度和生物利用度的潜在方法，可实现难溶性药物的递送或水溶性差异较大的两种药物的共递送。目前，超过10种纳米悬浮液产品已投放市场，表明临床应用潜力巨大<sup>[17]</sup>。因此，纳米悬浮产品引起了大量的研究人员的兴趣研究，主要有表面修饰以增强对疾病的靶向递送；另一方面，纯药物纳米粒具有作为药物运送的载体的潜力。然而，报道的纳米悬浮液只专注于研究其治疗作用而不是为药物提供载体功能。此外，化学治疗药的组合比例对于组合治疗的疗效至关重要，因为两种药物的比例决定了组合制剂协同作用和拮抗作用的可能性。因此，在纳米尺度上实现精确控制或调整组合载体中两种药物的质量比成为该领域的研究难题。传统载药中两种药物的精确控制都很差，它们载药量低且复杂的制备流程给质量控制带来困难。

综上所述，利用蛋白作为蛋白-药物复合晶体的稳定剂，通过形成NCs构建DDD平台经非溶酶体途径将药物导入细胞发挥协同作用，是一种很有前途的共同递送策略，有望同时实现化疗的增敏作用和MDR的逆转作用。

本项目拟通过构建紫杉醇-二氯乙酸纳米杂晶(PTX-DCA Ns)药物递送药物体系应用于NSCLC的联合治疗。为逆转PTX在NSCLC细胞中的MDR效应，本研究首先将PTX与DCA制备成杂晶。前期研究表明，棒状形态的纳米棒在合适的粒径下可通过小窝蛋白经非溶酶体途径入胞，可在PTX摄取促进细胞凋亡的同时，递送DCA降低应激性细胞自噬水平从而逆转MDR效应<sup>[16]</sup>。二者通过静电作用形成杂具有高载药量的纳米杂晶，经过静脉注射，在EPR效应的影响下在肿瘤微环境中累积。PTX和DCA潜在的联合作用可使得NSCLC细胞的凋亡水平提高且不引发MDR效应，抑制肿瘤生长从而发挥其抗NSCLC作用。

# 第一章 制备与表征

## 1.1 PTX-DCA Ns的制备

本节采用反溶剂沉淀法制备紫杉醇-二氯乙酸纳米杂晶(PTX-DCA Ns)。通过考察超声条件、双药比例和载药量对粒径PDI的影响，选择最佳超声参数和制备处方，进行后续实验。

### 1.1.1 制备方法的建立

首先制备变性的BSA溶液，用作杂晶体系的稳定剂。精密称量100 mg BSA放置于250 mL烧杯中，溶解于100 ml蒸馏水制备得1 mg/ml的BSA蛋白质溶液。用0.1 M HCl或NaOH将pH值调节至7.0，用磁力搅拌器在室温下搅拌2小时后用95 °C水浴加热30分钟，通过剪切力作用和热变性使BSA蛋白暴露疏水基团，放入4°C冰箱预冷备用。

然后通过转相沉淀法制备PTX-DCA Ns。精密称量10 mg PTX放入1.5 mL EP管，加入1 mL丙酮震荡溶解后加入2 mg (3.2 μL) DCA混匀。取10 mL预冷的变性BSA溶液置于4 °C冰浴，在搅拌状态下缓慢逐滴加入PTX与DCA混合丙酮溶液，滴加完成后立即用细胞破碎机探头超声，超声条件为250 W，持续15分钟；超声波脉冲设置为3秒，两次超声之间暂停4秒。超声处理过程中冰浴(4°C)控制温度。结束超声后将样品转移入100 mL圆底烧瓶，在25°C水浴、80 rpm条件下减压蒸发30分钟除去残留丙酮溶剂。旋蒸后将样品通过0.22 μm水性滤膜，取1 mL用蒸馏水稀释两倍后通过动态光散射仪(DLS)测定粒径和PDI，剩余样品用离心管封装4 °C冰箱冷藏保存<sup>[19]</sup>。

### 1.1.2 制备条件的优化

采用控制变量法考察超声参数，处方比例和载药量对PTX-DCA Ns粒径和PDI的影响。

#### 1.1.2.1 超声参数的优化

通过改变超声参数(超声功率与工作时间)，以考察超声条件对纳米杂晶粒径和PDI的影响。具体实验过程如下：精密称量10 mg PTX溶于1 mL丙酮，滴加2 mg (3.2 μL) DCA，平行制备6份。取一份样品逐滴加入1 g/mL d-BSA溶液，4°C冰浴条件下分别将六份样品在(200 W, 15 min), (200 W, 20 min), (250 W, 15 min), (250 W, 20 min), (300 W, 15 min), (300 W, 20 min)进行超声。样品按照1.1中建立的方法进行后续处理，根据测得的粒径与PDI确定最佳超声条件。

#### 1.1.2.2 处方比例的优化

通过在固定PTX用量的条件下改变DCA用量，以考察两种药物按不同处方比例投料对纳米杂晶粒径和PDI的影响。具体实验过程如下：精密称量六份10 mg PTX溶于1 mL丙酮，分别滴加2 mg (3.2 μL), 4 mg (6.4 μL), 6 mg (9.6 μL), 8 mg (12.8 μL), 10 mg (16.0 μL) DCA，每份样品按照1.1中建立的方法分别进行后续处理，根据测得的粒径与PDI确定最佳制备处方比例。

### 1.1.2.3 载药量的优化

通过在固定PTX和DCA质量比例的条件下改变两种药物的投料量，以考察两种药物按不同载药量投料对纳米杂晶粒径和PDI的影响。具体实验过程如下：分别精密称量六份5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg PTX溶于1mL丙酮，分别滴加1mg (1.6  $\mu$ L), 2 mg (3.2  $\mu$ L), 3 mg (4.8  $\mu$ L), 4mg (5.4  $\mu$ L), 5mg (8.0  $\mu$ L), 6mg (9.6  $\mu$ L) DCA，每份样品按照1.1中建立的方法分别进行后续处理，根据测得的粒径与PDI确定最佳最佳载药量。

## 1.2 PTX-DCA Ns的外表征

本节考察了1.1节制备条件下得到的制剂包封率情况，并通过TEM图片确证表面形态。

### 1.2.1. 包封率测定

采用HPLC法绘制DCA标准曲线和测定DCA含量。

#### 1.2.1.1 HPLC方法建立

使用十八烷基硅烷键合硅胶为固定相，色谱柱为Diamonsil® ODS (4.8mm × 200 mm, 5 mm)；分别配制甲醇-乙腈-水 (80 : 10 : 10), (60 : 30 : 10), (40 : 40 : 20) 作为流动相并用磷酸调节pH至2.0。设定UV检测波长设定为DCA的理论最大吸收波长214 nm，流速1 mL/min。配制0.2 mg/mL DCA溶液，单次进样量20  $\mu$ L；控制柱温25 °C。理论板数以DCA计算不低于2000，DCA与相邻杂质峰的分离度应符合大于1.5。

#### 1.2.1.2 标准曲线绘制

用移液枪精密取出10 mg DCA (32  $\mu$ L)并溶于50mL甲醇配制得到0.2 mg/mL DCA溶液，使用梯度稀释的方法逐级稀释制备0.15 mg/mL, 0.10 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.01 mg/mL溶液，与空白甲醇溶液共六个标准曲线点。样品0.22  $\mu$ m水性滤膜过滤后，设置进样为40  $\mu$ L，在2.1.1中所述色谱条件下进行HPLC分离和定量并记录色谱图。得到数据以DCA浓度为因变量、峰面积为自变量拟合DCA的标准曲线，计算回归方程。

#### 1.2.1.3 样品处理与检测

采用有机溶剂破坏法处理样品。将1.1.1及1.1.2中制备得到的全部样品取5 mL进行超高速离心处理，离心条件为10000 g, 4°C，获得底部粘稠状白色沉淀。预先配置pH 2.0甲醇溶液200 mL，使用磷酸调节pH。离心结束后立刻弃去上清，加入10 mL上述酸性甲醇震摇至完全溶解。设置进样量为20  $\mu$ L，在2.1.1所述色谱条件定量分析。

包封率计算公式为：EE% = 包封药物质量/投料药物质量 × 100%

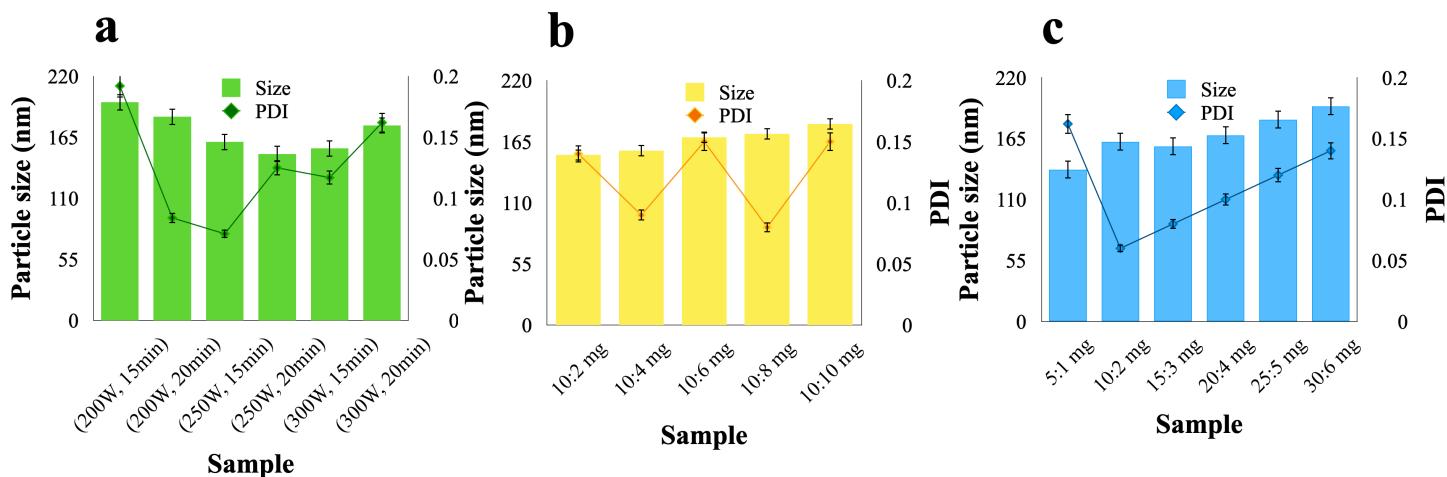
## 1.2.2 形态学表征

为获得PTX-DCA Ns的超微结构，采用透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscope, TEM) 在200 kV条件下进行观察。采用超滤离心管 (MWCO 3500 Da) 离心浓缩，取 10  $\mu$ L 制样拍摄 TEM，观察粒子形态。将一滴样品沉积在铜网上，然后在20 °C 干燥，然后用滤纸吸去多余的样品。用2% (w/w) 磷钨酸染色30 s，去除多余的磷钨酸后，网格在20 °C 下干燥5分钟放入TEM仪器观察并拍照<sup>[19]</sup>。

### 1.3. 结果与讨论

#### 1.3.1 制备

本阶段实验根据转相的原理，设计反溶剂结晶法制备纳米杂晶晶体，使用变性蛋白作为稳定剂控制晶体生长；通过控制变量法独立考察超声工作参数、处方比例和载药量对纳米杂晶粒径和PDI的影响，并以目标粒径、PDI和载药量为指标综合筛选和优化纳米杂晶制备条件。在优化超声条件实验部分，以粒径和PDI为因变量、超声条件为自变量获得数据如图一(a)，图像表明探头超声功率并非与粒径大小一直呈负相关，且超声时间的加长也可能破坏晶体结构和造成晶体聚集，从而使其分散均匀程度下降；在该变量实验中以250 W、15 min的超声参数作为最优条件。在优化药物比例实验部分，以粒径和PDI为因变量、处方比例为自变量获得数据如图一(b)，图像表明随DCA比例增大粒径呈现先减小后增大的趋势；在该变量实验中PTX: DCA=5:1 (mg/mg) 的处方比例作为最优制备处方。在优化载药量实验部分，以粒径和PDI为因变量、载药量为自变量获得数据如图一(c)。载药量从1 mg增加至30 mg (以PTX计)，外观从透明变化至微乳白色，表明随载药量增大呈先增大后减小趋势；在该变量实验中采用PTX=10 mg、DCA=2 mg的载药量作为制备处方。综合考虑，最终确立PTX: DCA=10 mg : 2 mg的制备处方以及250 W、15 min、开3 s关4 s的超声工作参数。该条件下可制备粒径 $160.48 \pm 0.62$  nm、PDI= $0.153 \pm 0.004$ 的纳米粒。



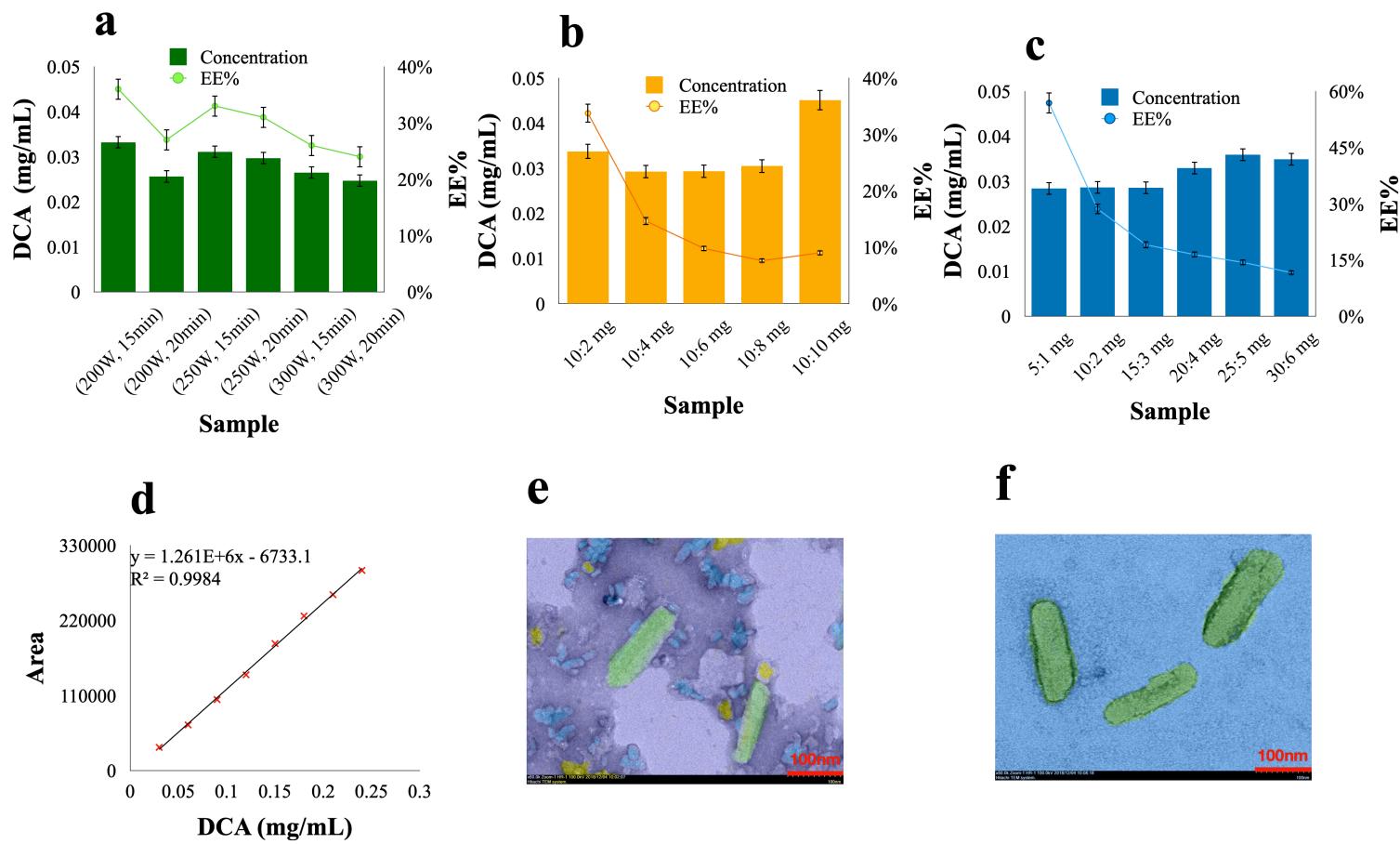
图一

(a) 超声功率对制剂粒径及PDI的影响；(b) 处方量对制剂粒径及PDI的影响；(c) 载药量对制剂粒径及PDI的影响。

#### 1.3.2 表征

根据HPLC多次进样结果，选择色谱流动相为甲醇-乙腈-水 (80:10:10) 并用盐酸调节pH至2.0，UV检测波长设定在220 nm有最大吸收。该色谱条件下DCA峰的理论塔板数 $> 15000$ ，峰形对称性较好，无明显拖尾现象，并且与杂质峰有明显分离，获得DCA标准曲线如图二(d)。标准曲线方程如为： $A=57076c+48450$ ，线性相关系数为 $R^2=0.9996$ ，在 $[0.00, 0.20]$  mg/mL区间内线性较好。将1.1.2中样品在相同色谱条件下逐一分析定量，获得包封率数据如图二(a) (b) (c)。由图像可得当处方配比为PTX:DCA=10:2 (mg/mg)时具有最大载药量，约为

33%。该结果说明，由1.1.2确定的最佳制备条件下获得的PTX-DCA Ns具有良好的包封率。TEM获得制备工艺优化前图片如图二(e)，优化后图片如图二(f)。两张图片均确证了PTX-DCA Ns(绿色)的形态为棒状，粒径约为160 nm，该结果与动态光散射粒径仪获得数据一致；优化制备工艺后获得的纳米粒不再出现蛋白碎片和PTX单晶(分别为图二(c)中黄色和蓝色部分)。



(a) 超声条件组浓度与EE%；(b) 处方量组浓度与EE%；(c) 载药量组浓度与EE%；(d) DCA标准曲线；(e) 优化前制备条件所得制剂，绿色为杂晶，黄色为BSA碎片，蓝色为PTX单晶；(f) 优化后制备条件所得制剂Ns，绿色为杂晶。

## 第二章 晶体结构确证与体外性质考察

### 2.1 结构确证

采用X射线粉末衍射，荧光共振能量转移和圆二色光谱法研究BSA与杂晶的结合模式。

#### 2.1.1 X射线粉末衍射

晶体内的原子排列方式使晶体具有不同的晶型，为验证PTX-DCA Ns棒状纳米粒具有与PTX晶体相似的晶体结构，采用X射线粉末衍射法 (Powder X-ray diffraction, PXRD) 扫描样品，考察PTX-DCA Ns晶体结构。

分别对PTX原料药，BSA粉末，PTX与BSA的物理混合物以及PTX-DCA Ns冻干粉末进行PXRD检测。将制备的PTX-DCA Ns样品放入冻干机，经过预冻，抽真空制得NRs冻干粉末。PXRD测定参数为：扫描范围为 $2\theta = [5^\circ, 50^\circ]$ ，扫描速度为 $1^\circ/\text{min}$ ，步长为 $0.02^\circ$ ，步进时间为0.3 s。在电压为40 kv，电流为40 mA，波长为1.54060 Å，铜靶， $\text{k}\alpha$ 线下获得衍射图<sup>[19]</sup>。

#### 2.1.2 荧光共振能量转移

荧光能量共振转移法 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 可以用于验证药物颗粒与蛋白质之间的相互作用。BSA作为稳定剂包裹在双药杂晶上，蛋白质会发生构象变化因此采用FERT法研究BSA的荧光猝灭模式，考察BSA与杂晶是否通过化学键键合。

以PTX: DCA=5:1 (mg/mg) 比例按1.1节所述方法制备不同载药量的PTX-DCA Ns (5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg, 载药量以PTX计)。采用荧光分光光度计对1 mg/mL未变性BSA溶液 (n-BSA)、1 mg/mL变性BSA溶液 (d-BSA) 以及上述7组样品进行扫描，得到其荧光发射光谱。荧光扫描的检测条件为：激发波长285 nm；发射波长范围400-600 nm；激发和发射的狭缝宽度分别为5 nm和10 nm<sup>[19]</sup>。

#### 2.1.3 圆二色光谱

圆二色光谱 (Circular dichroism, CD) 是常用的测定蛋白质二级结构的方法，因此采用圆二色光谱法研究BSA的二级结构在形成杂晶前后的变化情况，考察BSA与杂晶是否通过化学键键合。

以PTX: DCA=5:1 (mg/mg) 比例按1.1节所述方法制备不同载药量的PTX-DCA Ns (5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 载药量以PTX计)。采用圆二色谱仪扫描1 mg/mL n-BSA溶液、1 mg/mL d-BSA以及上述7组样品蛋白二级结构。圆二色谱的检测条件为：带宽1 nm；响应时间1s；波长范围250-190 nm；扫描速度100 nm/min；样品池长度0.1 cm；温度25 °C；蛋白浓度0.1 mg/mL<sup>[19]</sup>。

### 2.2 性质考察

稳定性是制剂性质参数随时间推移保持特性一致性的能力，本节通过测定粒径的变化评价PTX-DCA Ns在10%血清中的稳定性。

## 2.2.1 体外稳定性实验

将PTX-DCA Ns分散在含有10%血清的生理盐水中，在37 °C下，放入摇床(100 rpm)中，然后用动态光散射粒径仪在特定时间点(0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10和12小时)测定PTX-DCA Ns的粒径与PDI。其中制剂与血清按1:10 (mL/mL)混合<sup>[19]</sup>。

## 2.3 结果与讨论

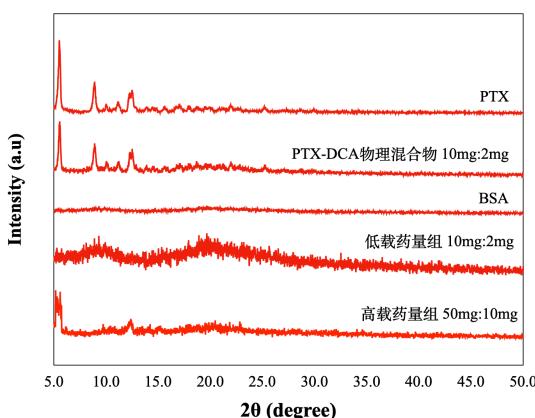
### 2.3.1 结构确证

#### 2.3.1.1 PXRD

PXRD是确定晶体内部结构的常用方法，可用于定性和定量分析。定性分析的信息有：物相组成、晶相或无定型、晶胞收缩或膨胀；当特定波长入射光 $\lambda$ 以特定角度 $\theta$ 照射晶体时，不同晶面均可发生光衍射，波长满足布拉格方程 $2dsin\theta=n\lambda$ 的衍射光发生相长，非整数倍时出现相消作用，形成连续的衍射环图样，衍射环强度最大处对应角度即为衍射角。由衍射角数值可以求得晶体中各晶面的间距d，从而揭示晶体的结构。将谱线与标准卡片比对可定性确定待测物的组成和晶相信息。定量分析的信息有：晶体的结晶度、晶粒大小和点阵常数。晶体的晶粒越小，其衍射线条越弥散和宽化，晶粒尺寸与PXRD谱图半峰宽满足谢乐公式 $D = K\gamma/Bcos\theta$ ；将最强衍射峰积分所得的面积( $A_s$ )当作计算结晶度的指标，与单一组分样品对应峰积分所得面积( $A_g$ )进行比较，结晶度= $A_s/A_g * 100\%$

影响衍射环质量的主要因素是样品的取样性偏差，即晶体的晶癖特征（如针状或片状）导致某些方向被过度衍射，而其他方向衍射不足。依照2.1.1实验方法获得样品呈片状，故在样品冻干后应将粉末混匀后挂取质地均匀的部分进行检测，获得PXRD图谱如图三。PTX具有精细谱峰结构，在 $2\theta=5^\circ$ ， $8^\circ$ ， $12^\circ$ 处显示出明显的衍射峰，表明其具有晶体形态；BSA没有出现衍射峰，属于无定型形态；PTX和BSA的物理混合物显示PTX的主要特征衍射峰。低载药量组PTX-DCA Ns谱图出现大包峰，这表明低载药量状态下药物是以非晶态存在；当载药量增加到50mg时，PTX-DCA Ns在 $2\theta=5^\circ$ 和 $12^\circ$ 处开始出现PTX的特征衍射峰，衍射峰弱于PTX单体衍射峰，定性表明高载药组PTX-DCA Ns具有与PTX相似的晶体结构，存在晶态和非晶态混合。

使用Jade 6.0软件对PTX和高载药量组的PXRD谱图进行定量分析。结果表明PTX单一组分晶体粒径约为137 nm，结晶度约为96.7%，高载药组PTX-DCA Ns粒径约为164 nm，结晶度62.4%。该结果与表征实验部分结论一致，并说明高载药组PTX-DCA Ns具有良好的结晶度。



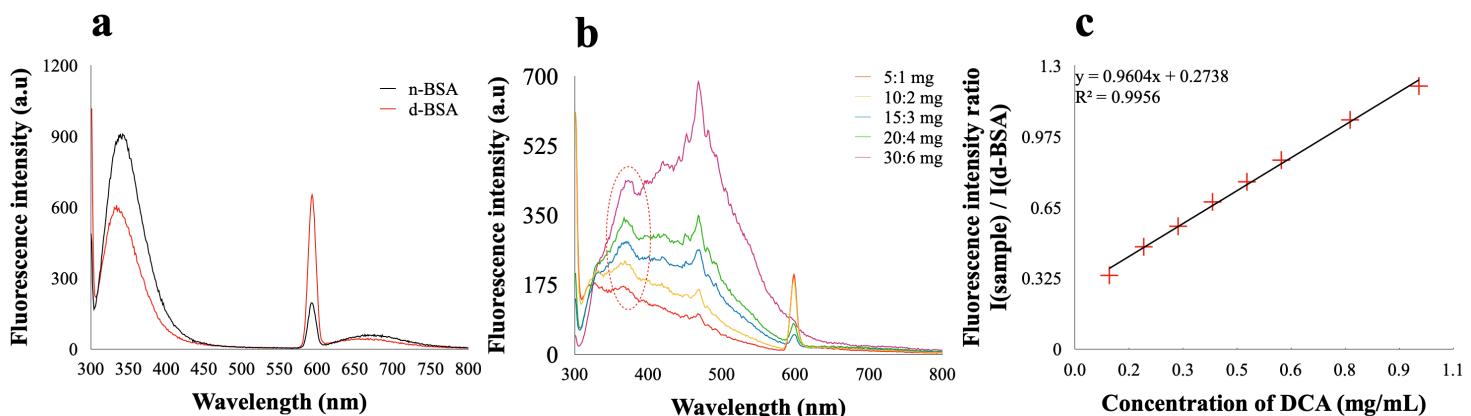
图三

PTX、PTX-DCA物理混合物、BSA、低载药量组和高载药量组PXRD图谱。

### 2.3.1.2 FRET

FRET法可以提供荧光团暴露于水环境的程度及其局部转变程度的信息。FERT是两个距离很近的荧光分子间产生的一种能量转移现象。当荧光供体分子的发射光谱与受体分子的吸收光谱重叠，同时两个分子的距离在10 nm范围内时，就会发生 FRET 现象，即供体发生荧光猝灭，受体荧光增强的现象。荧光猝灭可分为随机碰撞导致的动态猝灭模式，以及化学键结合导致的静态猝灭模式。激发波长340 nm处的荧光发射光谱主要由BSA蛋白疏水基中的Trp(色氨酸)残基产生，对位于蛋白质结构中的色氨酸残基进行选择性激发后，BSA会在一定波长处产生最大荧光，但由于蛋白质的构象变化，一旦Trp的局部环境受到干扰，荧光就会发生改变。因此，FRET可通过揭示蛋白质的构象变化，从而验证蛋白质与药物颗粒之间的相互作用。

由2.1.2实验方法获得荧光图谱如图四，(a)为未变性的蛋白BSA和变性的蛋白d-BSA的荧光发射光谱，(b)为不同载药量的PTX-DCA Ns的荧光发射光谱。由发射光谱所示，随着载药量的增加，制剂的最大荧光强度逐渐减小，与浓度呈明显负相关关系，这可能是由于蛋白与强极性物质DCA的结合进而减少了Trp疏水基的暴露，最终导致荧光猝灭。将荧光数据经Stern-Volmer方程验证计算得到拟合曲线图四(c)，得到方程： $y=0.9604x+0.2738$ ,  $R^2=0.9956$ ，满足线性关系，即证明DCA导致BSA静态荧光猝灭，两者通过化学键结合。FRET证实了BSA的Trp残基发生了向疏水性较低环境的转变，转变与浓度相关，且该转变是通过与DCA化学键结合实现。



图四

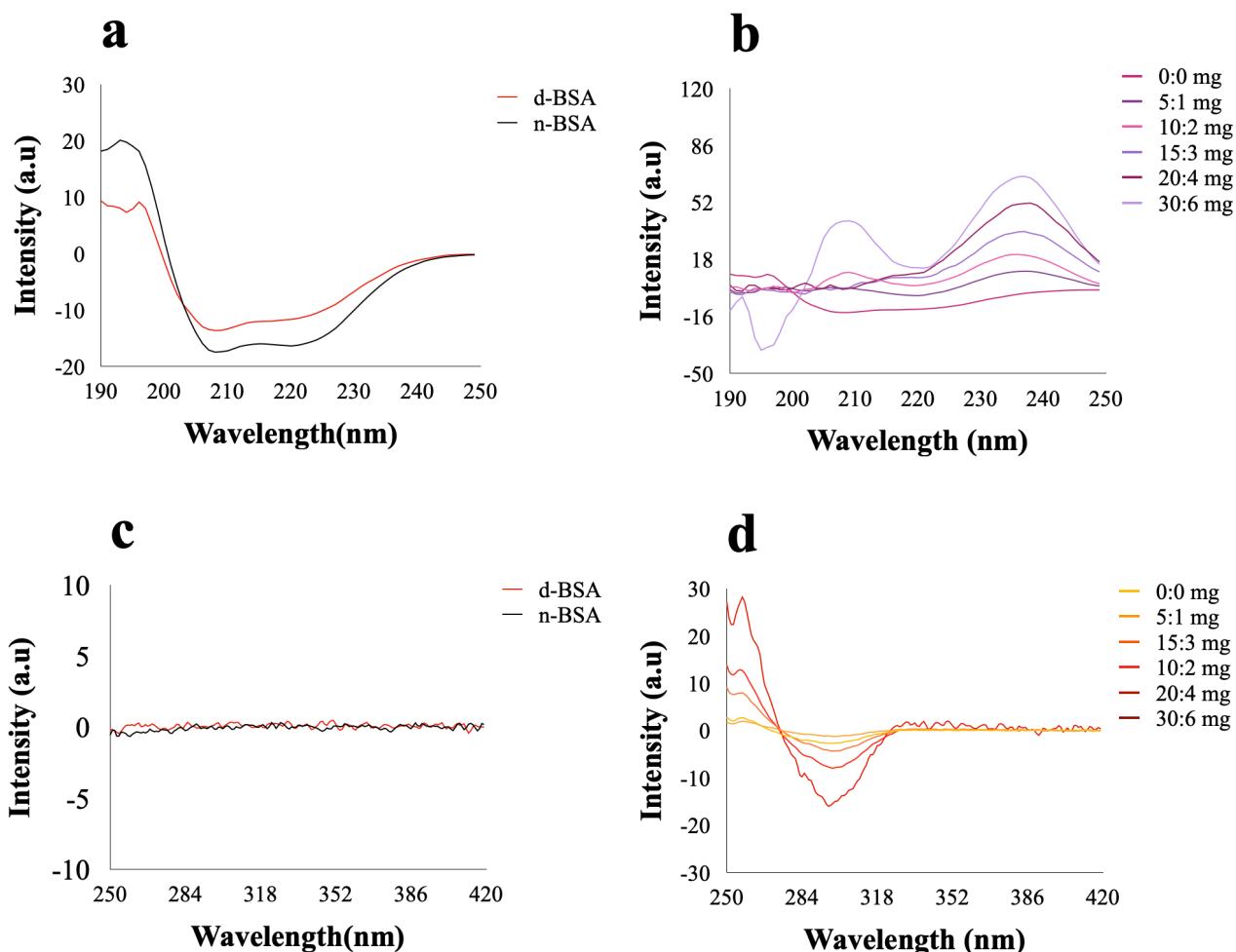
(a) BSA溶液的荧光光谱；(b) 制剂的荧光光谱；(c) 制剂和BSA光谱峰数据拟合的Stern-Volmer方程。

### 2.3.1.3 CD

CD是用于推断非对称分子的构型和构象的一种旋光光谱，光学活性物质对组成平面偏振光的左旋和右旋圆偏振光的吸收系数 $\epsilon$ 不等， $\epsilon_L \neq \epsilon_R$ ，即具有圆二色性，因此使用CD法进一步研究BSA包覆在药物颗粒表面后BSA二级结构的构象变化。

由2.1.3实验方法获得的Far UV-CD和Near UV-CD光谱如图六。比对BSA和制剂的Far UV-CD光谱可得，d-BSA在195 nm处出现窄峰，归属为 $\alpha$ -螺旋结构；制剂在235 nm处出现宽峰，可能是由于 $\alpha$ -螺旋结构转变为 $\beta$ -折叠结构，跃迁能量降低结构稳定性提高；同时，该宽峰较BSA对应峰发生红移，可能是由于引入生色基团，PTX-DCA Ns中大量存在的羟基与该

猜想符合；此外，该宽峰最小值随载药量的增加而增加，说明该种二级结构呈浓度依赖，与FRET得到化学键键合模式的结论一致。比对BSA和制剂的Near UV-CD光谱可得，d-BSA在该波段检测的结构不具备圆二色性；而制剂在260 nm处出现正峰，290 nm处出现负峰，分别对应 $\beta$ -转角和无规卷曲结构，可能是蛋白残基与杂原子结合导致其具备了光学活性。以上实验结果表明，PTX-DCA Ns中的BSA的二级结构发生改变，即BSA与PTX-DCA Ns之间存在相互作用，作用程度与载药量呈正相关，说明BSA对疏水性药物颗粒有着良好的稳定作用。



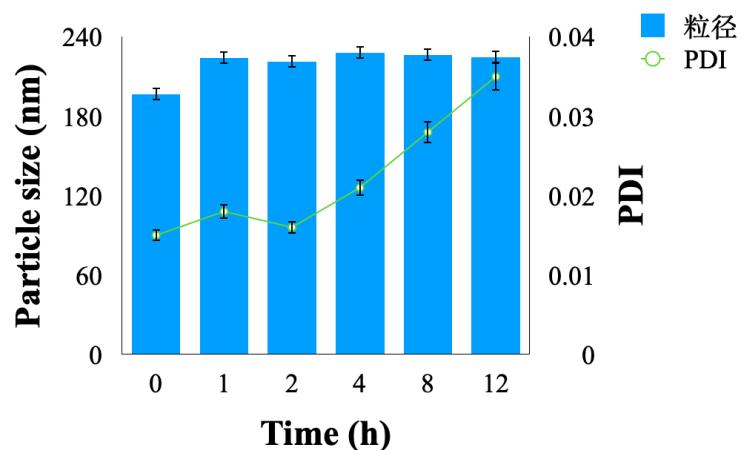
图五

(a) BSA Far UV-CD光谱；(b) 制剂 Far UV-CD光谱；(c) BSA Near UV-CD光谱；(d) 制剂 Near UV-CD光谱。

### 2.3.2 性质考察

#### 2.3.2.1 稳定性

通过测定PTX-DCA Ns在血清中的粒径和PDI变化，以1:5 (V/V)比，进一步研究血清中PTX-DCA Ns的稳定性。如图所示，12h内粒径和PDI没有很明显的变。这些结果表明，PTX-DCA Ns能够保持稳定。



图六

12小时制剂稳定性实验粒径和PDI

### 第三章 细胞水平有效性考察

#### 3.1 细胞培养和A549/Taxol耐药细胞株建立

用RPMI-1640培养基培养A549细胞。RPMI-1640培养基中加入10% FBS、100 U/ml青霉素和100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素，在37 °C，5%二氧化碳增湿培养箱中培养。

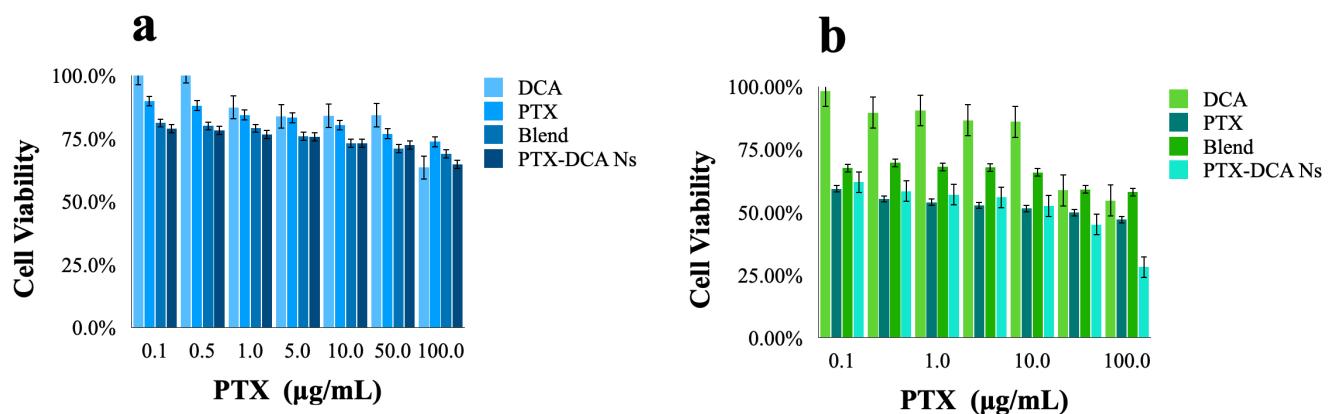
使用剂量递增法获得A549/TAX细胞。将A549细胞在RPMI-1640培养基培养48小时后到达对数生长期。接下来，在20 ng/mL的含PTX浓度下孵育24小时。由于紫杉醇诱导凋亡，敏感A549细胞死亡，然后收集存活细胞，在不含PTX的RPMI-1640培养基中培养至下一个细胞对数生长期。PTX使用浓度从20 ng/ml以梯度增加(20, 40, 60, 80, 100, 200, 300和400 ng/mL)。这个过程一直重复到A549细胞在含400 ng/ml紫杉醇的培养基中稳定生长<sup>[19]</sup>。

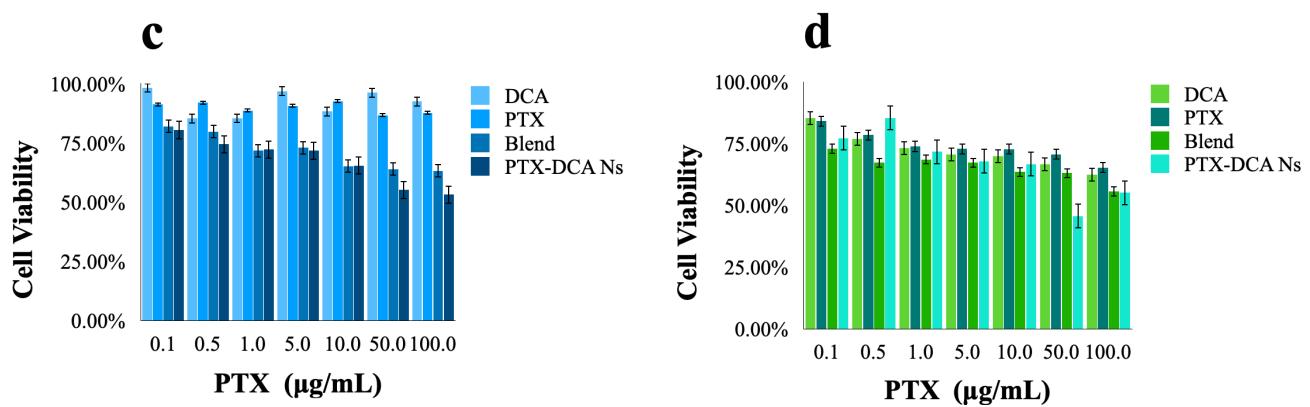
#### 3.2 细胞毒性实验

采用MTT法评估PTX-DCA Ns 对A549和A549/TAX细胞的细胞毒性。将细胞被植入96孔平板（5×10<sup>3</sup>细胞/孔）培养24 h使细胞贴壁。然后分别加入PTX溶液、DCA溶液、PTX-DCA物理混合溶液和PTX-DCA Ns溶液培养24h或48h。母液及浓度分别为：PTX溶液(10 mg/mL)，DCA溶液(2 mg/mL)，PTX-DCA物理混合溶液(10 mg/mL, PTX; 2 mg/mL DCA) 和PTX-DCA Ns(10 mg : 2 mg)，每份溶液用空白RPMI-1640培养基按稀释倍数10、20、50、100、500、1000倍(PTX浓度: 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )加入细胞孔。在这个实验中，未经处理的细胞作为对照每个浓度下设置三个孔作为平行。24或48 h后加入20  $\mu\text{l}$  PBS中的MTT溶液(5 mg/ml/well)，然后在37 °C下培养4小时后加入150  $\mu\text{l}$ 二甲基亚砜。最后，用分光光度计在570 nm处测定各孔的吸光度<sup>[19]</sup>。

#### 3.2 结果与讨论

24小时和48小时的MTT结果如图七所示。由图可知，随着PTX药物浓度从0.1增加到100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，所有制剂均表现出剂量依赖性的细胞毒性；并且，与单一药物PTX和DCA相比，两种药物的物理混合物和纳米杂晶PTX-DCA Ns 对A549细胞更大的毒性，该实验结果同样适用于A549/Tax细胞株，表明良好的细胞毒性效果。此外，PTX-DCA Ns处理的细胞活力明显低于PTX-DCA 物理混合物处理的细胞活力，表明纳米杂晶形态的PTX-DCA Ns具有更好的体外抗肿瘤作用。





图七.

(a) Normal A549细胞24 h MTT图像; (b) A549/Taxol细胞24 h MTT图像; (c) Normal A549细胞48 h MTT图像; (d) A549/Taxol细胞48 h MTT图像。

## 第四章 结论与展望

本项目提出了一种用PTX和DCA两种药物共同作用形成纳米杂晶制成的纳米悬浮液。以BSA为稳定剂，让两种药物形成具有合适参数的纳米杂晶，实现PTX和DCA的共递送并提高了这些PTX-DCA Ns的稳定性。通过药物与包被蛋白之间的疏水作用可控制晶体生长尺度，后续使用探头超声可进一步获得具有合适粒径和较窄粒径分布的纳米晶体。此外，简单的制备原理和过程可精确控制两种药物的装在比例和栗子形态，进一步暗示了纳米悬浮液在药物联用发挥抗肿瘤作用方向的潜力可能会提高。体外TEM图片表明PTX-DCA Ns呈细长棒状形态。本章还为PTX-DCA Ns的体外分析提供了方法，采用HPLC法绘制了DCA标准曲线，可精确测定纳米杂晶中药物的浓度，实验结果表明最适处方下的PTX-DCA Ns同时具有良好的包封率，可用作下一步实验。

结构确证部分采用PXRD、FRET和CD方法验证蛋白与双药晶体的结合模式。PXRD图谱显示，PTX-DCA Ns载药量较低时，药物在纳米棒中呈无定形状态，加大载药量后，药物粒子开始呈晶体状态。荧光光谱中荧光强度的变化及CD光谱中峰强和峰位的变化，说明了在PTX-DCA Ns中，BSA和药物杂晶之间存在着强烈的相互作用，且该作用是通过化学键实现。体外性质考察部分通过对PTX-DCA Ns在10%血清中特定时间点的粒径的测定，来考察PTX-DCA Ns的稳定性，结果显示，12 h内PTX-DCA Ns粒径和PDI都无明显变化，表明PTX-DCA Ns的在血清中的稳定性较好，可用作下一步实验。

最后进行了细胞水平的毒性实验以初步考察PTX-DCA Ns的有效性。首先根据适应症NSCLC选用A549细胞株，并通过梯度培养法建立PTX抗性A549细胞株。采用MTT方法考察细胞毒性，通过对比PTX溶液，DCA溶液，PTX-DCA物理混合物溶液和PTX-DCA Ns溶液24 h和48 h内的促凋亡效果评价PTX-DCA Ns的抗肿瘤效果。24 h和48 h的结果表明上述制剂均表现出剂量依赖性细胞毒性。

基于以上实验，本项目构建了PTX-DCA杂化型纳米晶体，设计了制备路线，建立了晶体性质研究、组分结合模式确证及体外稳定性考察的实验方法，并在细胞水平上初步验证了PTX-DCA Ns抗肿瘤有效性，为后续研究奠定基础。PTX-DCA杂化型纳米晶体主要针对NSCLC适应症与A549腺癌人类肺泡基底上皮细胞进行设计，PTX可杀死肿瘤细胞，通过DCA递送的补充逆转MDR效应，使肿瘤细胞对PTX的作用更加敏感，从而实现联合治疗，进一步提升药物的抗肿瘤效果，实现水溶性差异较大的药物的共同递送，纳米杂晶载体具有高载药量的优势。但是，本项目尚存在缺陷与不足，主要表现如下：(1). 本项目未涉及PTX-DCA双药协同效应机理研究；(2). 本项目未涉及PTX-DCA Ns的动物体内研究；(3). 本项目未涉及PTX-DCA Ns的靶向修饰的研究。

## 参考文献

- [1].Schmidt, K., Damm, K., Prenzler, A., Golpon, H., & Welte, T. (2016). Preferences of lung cancer patients for treatment and decision-making: a systematic literature review. European journal of cancer care, 25(4), 580 – 591. <https://doi.org/10.1111/ecc.12425>
- [2].COOPER, S. and SPIRO, S.G. (2006), Small cell lung cancer: Treatment review. Respirology, 11: 241-248. doi:10.1111/j.1440-1843.2006.00850.x
- [3].La - Beck, N.M., Nguyen, D.T., Le, A.D., Alzghari, S.K. and Trinh, S.T. (2020), Optimizing Patient Outcomes with PD - 1/PD - L1 Immune Checkpoint Inhibitors for the First - Line Treatment of Advanced Non – Small Cell Lung Cancer. Pharmacotherapy, 40: 239-255. doi:10.1002/phar.2364
- [4].Kiser, T.H., Obritsch, M.D., Jung, R., McLaren, R. and Fish, D.N. (2010), Efflux Pump Contribution to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 30: 632-638. doi:10.1592/phco.30.7.632
- [5].Lum, B.L., Gosland, M.P., Kaubisch, S. and Sikic, B.I. (1993), Molecular Targets in Oncology: Implications of the Multidrug Resistance Gene. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 13: 88-109. doi:10.1002/j.1875-9114.1993.tb02695.x
- [6].Kohler, D.R. and Goldspiel, B.R. (1994), Paclitaxel (Taxol). Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 14: 3-34. doi:10.1002/j.1875-9114.1994.tb02785.x
- [7].Zhou, L., Liu, L., Chai, W., Zhao, T., Jin, X., Guo, X., Han, L., & Yuan, C. (2019). Dichloroacetic acid upregulates apoptosis of ovarian cancer cells by regulating mitochondrial function. OncoTargets and therapy, 12, 1729 – 1739. <https://doi.org/10.2147/OTT.S194329>
- [8].Seliem, IA, Panda, SS, Grgis, AS, et al. Design, synthesis, antimicrobial, and DNA gyrase inhibitory properties of fluoroquinolone – dichloroacetic acid hybrids. Chem Biol Drug Des. 2020; 95: 248 – 259. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13638>
- [9].Scagliotti, G. V., Parikh, P., von Pawel, J., Biesma, B., Vansteenkiste, J., Manegold, C., Serwatowski, P., Gatzemeier, U., Digumarti, R., Zukin, M., Lee, J. S., Mellemgaard, A., Park, K., Patil, S., Rolski, J., Goksel, T., de Marinis, F., Simms, L., Sugarman, K. P., & Gandara, D. (2008). Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 26(21), 3543 – 3551. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0375>
- [10].Hanna, N., Johnson, D., Temin, S., Baker, S., Jr, Brahmer, J., Ellis, P. M., Giaccone, G., Hesketh, P. J., Jaiyesimi, I., Leighl, N. B., Riely, G. J., Schiller, J. H., Schneider, B. J., Smith, T. J.,

Tashbar, J., Biermann, W. A., & Masters, G. (2017). Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(30), 3484 – 3515. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.6065>

[11].Tempero, M. A., Malafa, M. P., Al-Hawary, M., Asbun, H., Bain, A., Behrman, S. W., Benson, A. B., 3rd, Binder, E., Cardin, D. B., Cha, C., Chiorean, E. G., Chung, V., Czito, B., Dillhoff, M., Dotan, E., Ferrone, C. R., Hardacre, J., Hawkins, W. G., Herman, J., Ko, A. H., … Darlow, S. (2017). Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 15(8), 1028 – 1061. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0131>

[12].Besse, B., Adjei, A., Baas, P., Meldgaard, P., Nicolson, M., Paz-Ares, L., Reck, M., Smit, E. F., Syrigos, K., Stahel, R., Felip, E., Peters, S., Panel Members, & ESMO (2014). 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: non-small-cell lung cancer first-line/second and further lines of treatment in advanced disease. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(8), 1475 – 1484. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu123>

[13].Mitragotri, S., Burke, P. A., & Langer, R. (2014). Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(9), 655 – 672. <https://doi.org/10.1038/nrd4363>

[14].Yin, H., Kauffman, K. J., & Anderson, D. G. (2017). Delivery technologies for genome editing. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(6), 387 – 399. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.280>

[15].Xin, X., Teng, C., Du, X., Lv, Y., Xiao, Q., Wu, Y., He, W., & Yin, L. (2018). Drug-delivering-drug platform-mediated potent protein therapeutics via a non-endo-lysosomal route. *Theranostics*, 8(13), 3474 – 3489. <https://doi.org/10.7150/thno.23804>

[16].Xin, X., Pei, X., Yang, X., Lv, Y., Zhang, L., He, W., & Yin, L. (2017). Rod-Shaped Active Drug Particles Enable Efficient and Safe Gene Delivery. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 4(11), 1700324. <https://doi.org/10.1002/advs.201700324>

[17].Chen, M. L., John, M., Lee, S. L., & Tyner, K. M. (2017). Development Considerations for Nanocrystal Drug Products. *The AAPS journal*, 19(3), 642 – 651. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0064-x>

[18].Cheng, Z., Lian, Y., Kamal, Z., Ma, X., Chen, J., Zhou, X., Su, J., & Qiu, M. (2018). Nanocrystals Technology for Pharmaceutical Science. *Current pharmaceutical design*, 24(21), 2497 – 2507. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180518082420>

[19].Mohammad, I.S., He, W. & Yin, L. A Smart Paclitaxel-Disulfiram Nanocrystals for Efficient MDR Reversal and Enhanced Apoptosis. *Pharm Res* 35, 77 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2370-0>

## 致谢

子在川上曰，逝者如斯夫，不舍昼夜。丙申入宁，瞬息庚子，值成文之日，草书数语，聊表谢忱。

经师易得，人师难求。丁酉初，得恩师尹莉芳教授与何伟教授之殊遇，诲我以道，授我以业，知遇并栽培之恩未可胜计。师长经年言传身教，亦师亦友；循循以导，谆谆以教，正襟治学，晨昏弗怠，实为吾辈之楷模。而又生性宽厚，至诚至公，未以愚顽见弃，使余可窥正道，余幸得恩师如此。初，念余新学，唤先学以引，消余忧惧；后学得皮毛，又授我以题，令赜探隐索，余经此历练而豹变，每思及此，倍感其恩。北面数年，得见师门腾声飞实，成果沓至，常感治学者当如是也，源流至臻，与有荣焉。及己亥，彼余迁擢之年，前路未卜，幸得师长引荐吕万良教授提点，示我以路，慰我以典故，待我与门生无异，此指路并提携之恩，永矢弗谖。

学贵得师，亦贵得友。何德何能，所遇之人皆不偏不倚。师门同侪，赫赫堂堂，互助互勉，受益匪浅。师姐曰雅琪，曰晓斐，曰宸诗，曰青青，以彼明德笃学，策我践履维新，使我得立前人之肩，有所远见；又念余初辞桑梓，关怀备至，个中情谊，不尽欲语。余得成文，乃得师兄滕超斧正拙笔，凡数载倾之所学引我助我，始终如一，其才学余所慕也，此同胞同泽之谊，余感佩甚矣。古人云入芝兰之室，与之同化，诚不欺我也。科研之道亦难矣，虽举步维艰，然寸进寸喜，学亦有伴，终得悟此中之乐也。兰舟催发，后会有期，愿诸君学有所成，各列凌烟，挥斥方遒，会于峰顶，苟富贵，其勿相忘也。

昔余二九之年，齿少心锐，然心志犹未壮，稍有不遂，常怀忧惧，期间种种坎坷不表，幸有严慈支持，得有今日。余童稚时，尝随母入汉，彼余父之谋博士之资也。余虽年幼，见俊采星驰，切磋学艺而不囿于简牍，当是时立志效父；然苦学数年，方知此道仰之弥高，置身其中，自觉微若陌上砂砾。然青灯黄卷，真理无穷，此亦父母途径路，今有寸得则足以欢欣矣。犹记前岁返家，忽见离家所植之紫杉已蔚蔚然，彼余以木为誓，学成方归，又及四年逢恩师授题紫杉，乃以此为业，研索至今，岂非天意乎，每思于此，心神震动。常思莼鲈，常感顾复之恩深重，常念需立业及严慈之未老也。拳拳之心，夙兴夜寐，愿今日之弱柱得成门庭之顶梁，无忝为人子。

胜地不常，年日易损。既以无远弗届为志，经年枕戈待旦以谋尺寸之功，不敢废光阴之厘毫；今当远离，如箭在弦上，将往涉重洋，以期效故邦。临别所思，当有三愿，一愿长辈安康，二愿挚友常见，三愿永怀赤子心，不负手中剑。大学之道，方兴未艾；道之所及，虽千万人吾往矣。余愿以精业济群之心，行兴药为民之事，自强不息，止于至善。