

聚苹果酸-羟喜树碱前药的合成和性质初探*

乔友备¹ 张海涛² 李 飞¹ 李 伟¹ 段 晓¹ 成 冲¹ 陶阳春¹ 吴 红^{1△}

(1 第四军医大学药学院药物化学教研室 陕西 西安 710032 2 西北工业大学理学院 陕西 西安 710072)

摘要 目的: 化学全合成聚苹果酸(poly(β -malic acid), PMLA) 将其作为高分子药物载体, 制备聚苹果酸-羟喜树碱前药(PMLA-HCPT)。研究其体外释药特点和体外细胞毒性。方法: 以 L-天冬氨酸为原料, 通过化学方法全合成 PMLA, 通过酰胺键键合羟基喜树碱(HCPT)。通过红外光谱、核磁共振光谱表征该前药的结构, 利用体外动态透析的方法模拟体外释药特点, 用高效液相色谱法测定不同 pH 值聚合物药物中前喜树碱的释药特性。采用人卵巢癌 HO-8910 细胞系研究该前药的体外毒性。结果: ①经核磁共振表征 PMLA-HCPT 前药合成完成。②在 pH 5.6、pH 6.8 及 pH 7.4 的 PBS 缓冲体系 16 h 中, 羟喜树碱药物累积释放率分别为 76.8%、47.2% 和 18.1%, 证实 PMLA-HCPT 中羟喜树碱的释放具有 pH 依赖性。③细胞实验证实 PMLA-HCPT 的细胞毒性和游离的 HCPT 相比没有降低。结论: PMLA 是一种良好的药物载体材料, PMLA-HCPT 有望成为具有 pH 敏感性的聚合物前药。

关键词 聚合物药物 聚苹果酸 羟喜树碱 药物转运系统

中图分类号 R284.3 R944.2 文献标识码 A 文章编号: 1673-6273(2012)17-3253-06

Prodrug of Poly(β -malic acid)-Hydroxycamptothecin Polymer:
Preparation, Characterization and Biological Evaluation*QIAO You-bei¹, ZHANG Hai-tao², LI Fei¹, LI Wei¹, DUAN Xiao¹, CHENG Chong¹, TAO Yang-chun¹, WU Hong^{1△}

(1 Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi, 710032, China;

2 School of Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an Shaanxi, 710072, China)

ABSTRACT Objective: Poly (β -malic acid) (PMLA) was synthesized, and used as polymeric drug carrier. A novel poly(β -malic acid)-hydroxycamptothecin conjugate (abbreviated as PMLA-HCPT) for active tumor targeting was set up. **Methods:** The structure of this prodrug was confirmed by FT-IR and ¹H-NMR. Furthermore, the conjugation efficiency, drug release property of the prodrug was determined. The cytotoxicity were assessed by using human ovarian cancer HO-8910 cell lines as in vitro cell model. **Results:** (1) The conjugates were prepared successfully. (2) In vitro HCPT release from PMLA-HCPT conjugate occurred at a faster rate at acidic pH compared with neutral pH (7.4). The released free HCPT after 16 h of incubation at pH 5.6, 6.8 and 7.4 was 76.8 %, 47.2 % and 18.1 %, respectively. (3) The cytotoxicity of PMLA-HCPT conjugates against HO-8910 cells, were not lower than free HCPT. **Conclusion:** PMLA is a good drug carrier material. PMLA-HCPT conjugate could be used as a promising hydroxycamptothecin carrier.

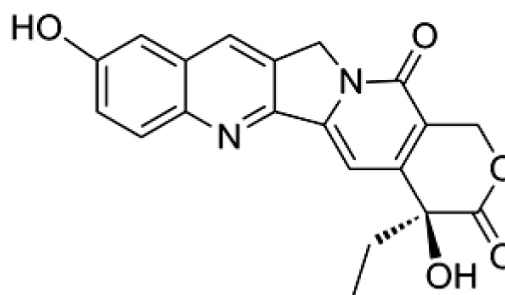
Key words: Polymeric drug; Poly(β -malic acid); Hydroxycamptothecin; Drug delivery system

Chinese Library Classification(CLC): R284.3, R944.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)17-3253-06

前言

羟喜树碱 (10-hydroxycamptothecin, HCPT) 是从珙桐科植物喜树中分离得到的内酯生物碱^[1], 其结构可见图 1。HCPT 是 DNA 拓扑异构酶 I (Topo I) 抑制剂, 能够特异地与拓扑异构酶 I 结合, 中断 DNA 双链合成, 具有显著的抗肿瘤活性^[2]。它抗癌谱广, 对肺癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌和胃癌等具有显著的抗肿瘤活性^[3], 无交叉耐药性, 目前已作为临床一线用药。但是, 由于羟喜树碱难溶于水 and 大部分有机溶剂, 且具有不稳定性, 限制了其应用^[4]。本研究采用聚苹果酸作为药物载体, 将 HCPT 通过酰胺键键合到 PMLA 主链上, 得到 PMLA-HCPT 前药, 能够克服 HCPT 水不溶性的缺点, 并且没有降低药物的抗肿瘤性质。



10-hydroxycamptothecin

图 1 10-羟喜树碱

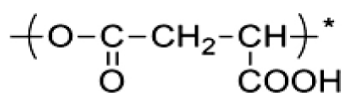
Fig. 1 10-Hydroxycamptothecin

* 基金项目 国家自然科学基金项目(30970788)

作者简介 乔友备(1987-) 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 聚合物药物载体, Tel: 15202469088, E-mail: youbei08@163.com

△通讯作者 吴红 电话: 029-84774473, E-mail: hongwuxa@hotmail.com

(收稿日期: 2012-02-23 接受日期: 2012-03-18)

poly(β -malic acid)图2 β -聚苹果酸Fig. 2 Poly(β -malic acid)

聚苹果酸(见图2)具有良好的水溶性、生物相容性和可降解性^[5],它在体内的代谢产物是苹果酸,可以直接进入人的三羧酸循环(TCA cycle),所以没有毒性和免疫原性^[6],是理想的生物材料。聚苹果酸上含有悬挂羧基,药物(阿霉素、5-氟尿嘧啶等)可以通过酰胺键或酯键与PMLA主链结合,做成前药^[7,8],此外,还可以将一些功能基团(如反义寡核苷酸、单克隆抗体等)通过共价结合的方式键合到PMLA上,做成靶向脑肿瘤的药物输送系统^[9-12]。由于聚苹果酸良好的水溶性,本研究中将聚苹果酸作为载体,通过酰胺键将抗肿瘤药物HCPT键合,得到水溶性较好的PMLA-HCPT前药,探索该聚合物前药响应不同pH释药的特性,为进一步研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和仪器

L-天冬氨酸,上海楷洋生物技术有限公司;溴化钠,天津市

登封化学试剂厂;三氟乙酸酐(TFAA),济南万兴达化工;10-羟基喜树碱(HCPT)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二甲氨基吡啶(DMAP)等均购自Sigma和TCI;三乙胺(TEA)由天津市博迪化工有限公司提供;其他试剂均由西安试剂厂提供。紫外分光光度计(BECKMAN DU640)、冷冻干燥机(Vir-Tis SP TechCare)、油电二用恒温培养箱、真空干燥箱(大连第四仪表厂)、恒温水浴锅、DF-型集热式磁力搅拌器(河南巩义)、核磁共振仪(Avance DMX500, Bruker公司)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 聚苹果酸的化学全合成 参考文献^[13-15]的方法,并加以改进。①以L-天冬氨酸为原料,将氨基重氮化后用溴取代,制备溴代丁二酸。②将溴代丁二酸在TFAA催化下脱水得到溴代丁二酸酐,再与苯甲醇作用得到溴代丁二酸苄基酯。③在弱碱性条件下,溴代丁二酸苄基酯发生分子内酯化反应,生成 β -苄氧羰基 β -丙内酯(MLABz)。④MLABz在引发剂苯甲酸四乙基铵存在的条件下开环聚合形成聚苹果酸苄基酯(PMLABz),最后氢解除去苄基得到PMLA。将得到的PMLA溶于水,用透析袋透析,除去分子量较小的聚合物,之后冷冻干燥得到PMLA。其中,③步反应是影响PMLA产率的关键步骤,由于四元环内张力大,所以产率比较低。本研究考察了反应体系pH和反应时间对产率的影响。

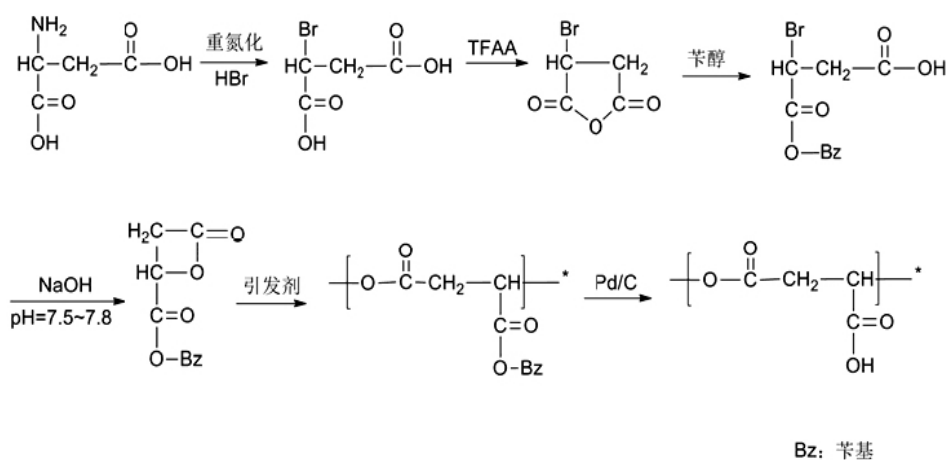


图3 PMLA的合成路线

Fig. 3 Synthetic route of PMLA

1.2.2 HCPT的结构修饰 本课题组已经证明聚合物药物中的酰胺键能够响应肿瘤组织的pH值断裂,释放出药物^[16]。故本研究中对HCPT进行结构修饰^[17],引入氨基,使HCPT能够通过酰胺键和PMLA主链相连。将t-boc glycine(350 mg, 2 mmol)溶于200 ml无水CH₂Cl₂中,磁力搅拌,冰水浴,加入HCPT(255 mg, 0.7 mmol)、DCC(412 mg, 2 mmol)、DMAP(85.4 mg, 0.7 mmol)。0℃下反应1 h,后室温下避光反应12 h。反应完毕后用0.1 mol·L⁻¹的HCL洗涤,干燥后旋转蒸发除去溶剂,得白色固体。将所得固体溶于CH₂Cl₂(15 mL)和TFA(15 mL)混合液中,室温下反应1 h。反应完毕后旋转蒸发除去溶剂,得淡黄色固体,用CH₂Cl₂重结晶一次,得到结构修饰后的HCPT

(NH₂-HCPT)。

1.2.3 PMLA-HCPT前药的合成 将PMLA(11.6 mg, 含-COOH 0.1 mmol)、NH₂-HCPT(42.1 mg, 0.1 mmol)溶于10 ml DMF中,依次加入EDC·HCl(19.2 mg, 0.1 mmol)、TEA(14 mL, 0.1 mmol),氮气保护,室温下避光反应24 h。反应结束后用DMF透析24 h除去没有反应的小分子药物,然后用去离子水透析48 h除去溶剂,将透析袋内的溶液冷冻干燥。利用紫外分光光度计法在波长413 nm处测定PMLA-HCPT中药物的质量,计算该前药的载药量。载药量计算公式如下:

$$\text{聚合物药物载药量} = \frac{\text{聚合物药物中药物的质量}}{\text{聚合物药物的质量}} \times 100\%$$

本研究还通过改变反应产物中 PMLA 和 $\text{NH}_2\text{-HCPT}$ 的比例,研究其对载药量的影响。

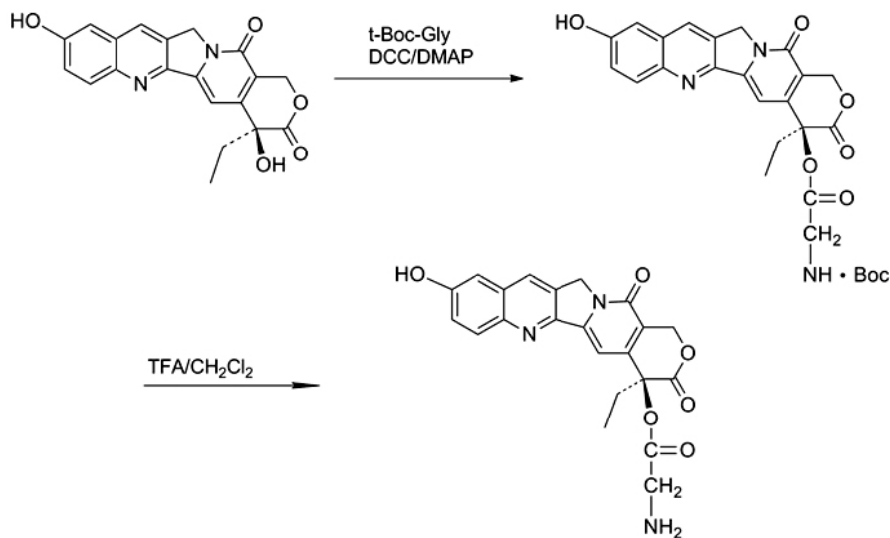


图 4 HCPT 的结构修饰

Fig. 4 Structural modification of HCPT

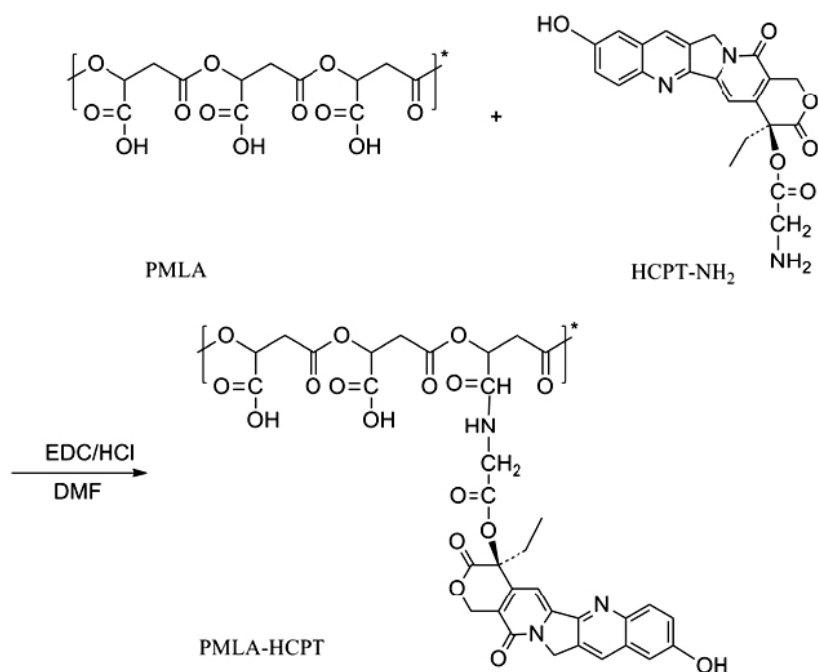


图 5 PMLA-HCPT 的合成路线

Fig. 5 Synthetic route of PMLA-HCPT

1.2.4 结构表征 使用溴化钾压片法对中间产物和最终产物进行红外光谱法表征;以 DMSO- d_6 为溶剂,四甲基硅烷为内标,通过 $^1\text{H-NMR}$ 表征 PMLA、HCPT 和 PMLA-HCPT 的结构。

1.2.5 PMLA-HCPT 的体外释药研究 准确称取三份 24 mg PMLA-HCPT 溶于透析袋内,分别以 200 mL pH 为 5.6、6.5、7.4 的缓冲液为释放介质,37℃,100 rpm 搅拌。设定时间间隔内移取 0.5 mL,同时补充相同体积的相应缓冲液。释放出来的药物浓度用高效液相色谱法(HPLC)进行测定。

色谱条件 Diamonsil C18 柱 (5 μm , 200 mm $\times$ 4.5 mm), C18 预柱 (5 μm , 10 mm $\times$ 4.6 mm) 流动相:甲醇:乙腈:水(20:

18:62); 荧光检测器检测,激发波长 363 nm,发射波长 550 nm;流速:1.0 mL/min;进样量 20 μL ;灵敏度:AUFS=1.0;柱温:25℃。在此条件下,羟喜树碱的保留时间为 8.93 min。

1.2.6 PMLA-HCPT 的细胞毒性研究 将对数生长期的卵巢癌 HO-8910 细胞制成 1×10^4 mL 的细胞悬液,按每孔 200 μL 接种到 96 孔板上,分别加入不同药物浓度 (20 ng/mL-450 ng/mL) 的 HCPT 和 PMLA-HCPT 溶液,每种浓度设 3 个复孔,并设空白对照。24h 后用 MTT 法测定不同浓度的药物对细胞的抑制率。

细胞抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times$ 100%

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数± 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示 ,用 SPSS17.0 软件处理数据 ,两组间均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 聚苹果酸(PMLA)的合成

PMLA 的化学合成中 ,最为关键的是溴代丁二酸苄基酯形

成四元环内酯的步骤。Cammass, S^[13]采用多次提纯中间产物的方法 ,将产率提高到了 15 %。本实验中 ,在生成溴代丁二酸酐后 ,对得到的酸酐进行重结晶 ,并且在溴代丁二酸苄基酯生成 MLABz 的过程中 ,动态调节体系的 pH 值在 7.5~7.8 ,使反应的产率提高到了 30 %左右。这表明反应体系的 pH 值对产率有很大的影响。本实验中 ,对比了不同反应时间对产率的影响(表 1)。实验表明 ,适当延长反应时间有助于产率的提高。

表 1 反应时间对产率的影响
Table 1 The effect of reaction time on yield

Reaction medium	PH	Time(h)	Yield(%)
CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O	7.5~7.8	2	9
CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O	7.5~7.8	4	30
CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O	7.5~7.8	8	32
CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O	7.5~7.8	12	35
CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O	7.5~7.8	24	30

2.2 PMLA-HCPT 的合成

通过改变 PMLA 和 NH₂-HCPT 的比例 ,得到载药量更高

的 PMLA-HCPT 前药。实验表明加大 NH₂-HCPT 的比例 ,可以提高聚合物药物的载药量(表 2)。

表 2 反应物用量对载药量影响
Table 2 The effect of amount of reactants on drug loading

PMLA(mmol)	NH ₂ -HCPT(mmol)	Time(h)	Drug loading(%)
0.1	0.1	24	0.67
0.1	0.2	24	0.86
0.1	0.3	24	3.4
0.1	0.4	24	4.5

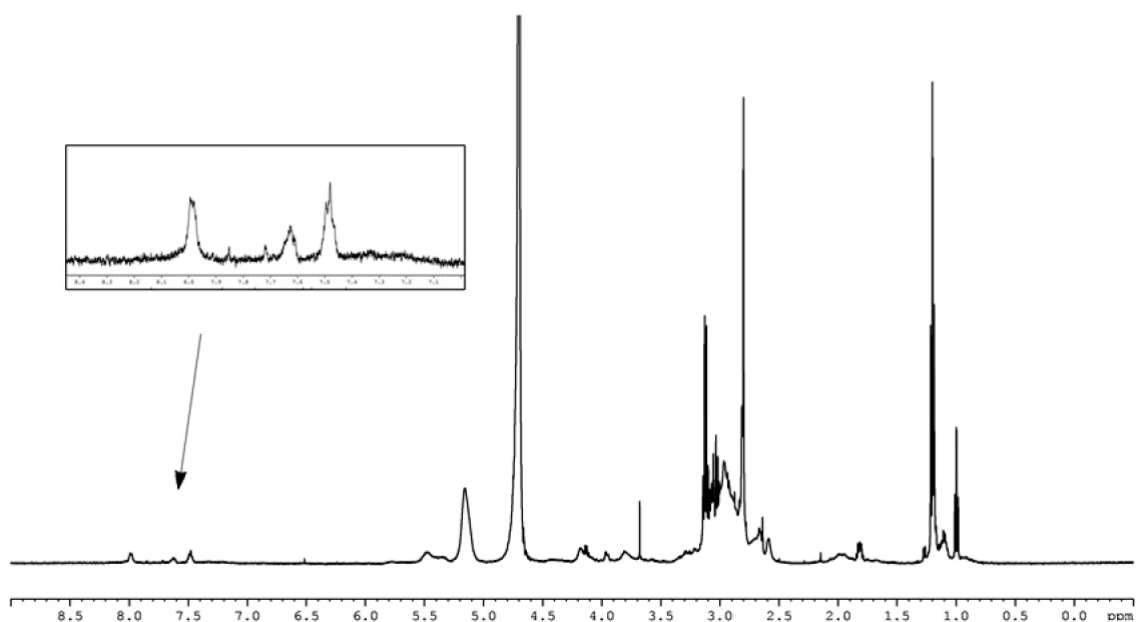


图 6 PMLA-HCPT 核磁共振氢谱图
Fig. 6 1H-NMR spectrum of PMLA-HCPT

2.3 结构表征

PMLA-HCPT 红外光谱中 1625cm^{-1} 处有酰胺键特征峰,表明 HCPT 是通过酰胺键和 PMLA 主链结合(图略)。图 6 为 PMLA-HCPT 的核磁共振氢谱图。图中 2.0 ppm 和 5.1 ppm 处为 PMLA 主链上的氢, 3.2 ppm 为与酰胺键相连的亚甲基上的氢, 5.5 ppm 处为 HCPT 中酚羟基上的氢, $7.5\text{--}8.0\text{ ppm}$ 对应的是 HCPT 中母环上的氢。由谱图可以判定目标产物的生成。

2.4 PMLA-HCPT 的体外释药研究

PMLA-HCPT 在不同 pH、温度为 37°C 的释药曲线如图 7 所示。PMLA-HCPT 在 pH 5.6、6.8 及 7.4 的磷酸盐缓冲体系(PBS)16 h 中,HCPT 的累计释放率为 76.8%、47.2%及 18.1%,随着 pH 的增大,HCPT 的累积释药率有明显差异,且逐渐变小。表明该体系的释药具有明显的 pH 依赖性。在生理 pH(pH 7.4)时,药物释放很少,能够很好地保护药物。一旦外界环境中的 pH 降低,就能够大量的释放药物,发挥抗肿瘤作用。基于这种作用,PMLA-HCPT 可以用于抗肿瘤药物的靶向释放。

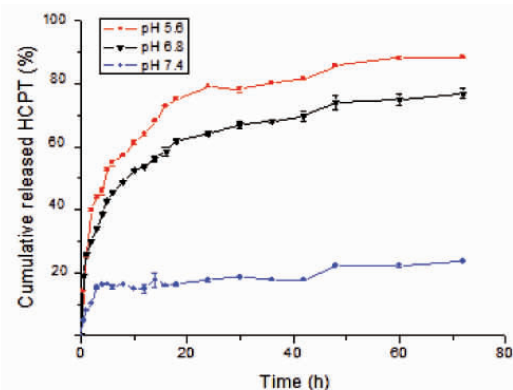


图 7 在 37°C 不同缓冲液中的释药曲线

Fig. 7 Cumulate release profile of PMLA-HCPT under different buffer at 37°C

2.5 PMLA-HCPT 的体外细胞毒性研究

图 8 所示,载体 PMLA 没有明显的细胞毒性,PMLA-HCPT 和 HCPT 的体外细胞毒性相似。究其原因,PMLA-HCPT 前药是通过化学键断裂,释放出 HCPT 发挥抗肿瘤效果。本实验没有探究 PMLA-HCPT 前药进入细胞的机制。

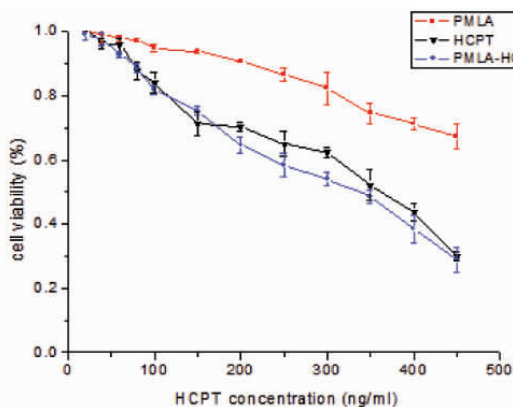


图 8 PMLA、HCPT 和 PMLA-HCPT 的细胞毒性

Fig. 8 Viability of HO-8910 cells after exposure to PMLA, HCPT, PMLA-HCPT conjugate at various drug concentrations at 37°C for 24h

3 讨论

随着生命科学和高分子科学的交叉发展,越来越多具有良好生物相容性和可降解性的高分子材料出现,并应用到药物研发领域。高分子聚合物药物为药物分发展提供了广阔的空间。一些传统的药物,以抗肿瘤药物为例,比如阿霉素和紫杉醇等,具有优良的抗肿瘤活性,但由于其水溶性较差、毒副作用高、在人体能易被代谢失活以及耐药性等不足都限制了它们在临床上的应用。聚合物药物的发展,为这些药物的临床应用提供了新的发展机遇^[18]。目前研究较多的聚合物载体有聚乙二醇(PEG),以 PEG 为载体的药物 PEG-CPT 药物已经被证明在动物体内对实体瘤有明显的抗肿瘤活性^[19,20]。但是 PEG 作为药物载体,只能在端基通过化学键和药物接合。此外,对于取代的丙烯酸, N-(2-羟基)异丁烯酰胺(HPMA)等的研究也比较多,其中以 HPMA 为载体制备的 HPMA-CPT 聚合物药物在动物体内已经表现出了良好的控释和缓释性^[21-23]。但是这类载体同样存在着体内不能降解等缺点。因此本研究中采用聚苹果酸作为药物载体,通过酰胺键键合抗肿瘤药物羟基喜树碱,制备成聚合物前药 PMLA-HCPT,提高了药物的水溶性,降低了药物对正常组织的毒副作用。

通过体外释药和体外细胞毒性研究,我们发现 HCPT 释放具有 pH 依赖性,在生理 pH(pH 7.4)时能够较少的释放药物,而在更酸性的环境下(pH 5.6 或 pH 6.8),HCPT 释放的较快。聚合物前药这种特性非常适用于抗肿瘤药物的靶向释放,因为肿瘤组织的 pH 要低于正常组织的 pH^[24],当 PMLA-HCPT 前药到达肿瘤组织后,可以响应肿瘤组织的 pH,释放出游离的 HCPT,发挥抗肿瘤作用。肿瘤细胞中早期内涵体的 pH 在 6.0 左右^[25],有的甚至低于 5.4^[26,27],而晚期内涵体的 pH 值一般在 5.0 左右^[27]。细胞毒性试验表明 PMLA-HCPT 聚合物药物没有降低其细胞毒性,可有望成为一种 HCPT 智能型控释和靶向性药物载体。

参考文献(References)

- [1] Lorence A, Medina-Bolivar F, Nessler C L. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from Camptotheca acuminata hairy roots [J]. Plant Cell Reports, 2004, 22(6):437
- [2] Pu X, Sun J, Wang Y, et al. Development of chemically stable 10-hydroxycamptothecin nanosuspensions[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 379(1):167-173
- [3] Tong R, Cheng J. Controlled synthesis of camptothecin-poly(lactide) conjugates and nanoconjugates[J]. Bioconjug Chem, 2010, 21(1):111-121
- [4] Kunii R, Onishi H, Machida Y. Preparation and antitumor characteristics of PLA/ (PEG-PPG-PEG) nanoparticles loaded with camptothecin [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2007, 67(1):9-17
- [5] Huang Z W, Laurent V, Chetouani G, et al. New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery [J]. Int J Pharm, 2011, 423(1):84-92
- [6] Fernandez C E, Mancera M, Holler E, et al. High molecular weight methyl ester of microbial poly(β , l-malic acid) Synthesis and crystallization[J]. Polymer, 2006, 47:6501-6508
- [7] Leboucher-Durand M, Langlois V, Guerin P. Poly(β -malic acid) deri-

- vatives with unsaturated lateral groups epoxidation as model reaction of the double bonds reactivity [J]. *Reactive & Functional Polymers*, 1996, 31:57-65
- [8] Gaucher G, Marchessault R H, Leroux J C. Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes [J]. *J Control Release*, 2010, 143(1):2-12
- [9] Lee B S, Fujita M, Khazenon N M, et al. Polycefin, a new prototype of a multifunctional nanoconjugate based on poly (beta-L-malic acid) for drug delivery[J]. *Bioconjug Chem*, 2006, 17(2):317-326
- [10] Fujita M, Khazenon N, Ljubimov A, et al. Inhibition of laminin-8 in vivo using a novel poly (malic acid)-based carrier reduces glioma angiogenesis[J]. *Angiogenesis*, 2006, 9(4):183
- [11] Fujita M, Lee B, Khazenon N M, et al. Brain tumor tandem targeting using a combination of monoclonal antibodies attached to biopoly (beta-L-malic acid)[J]. *Journal of controlled Release*, 2007, 122:356-363
- [12] Ljubimova J Y, Fujita M, Khazenon N M, et al. Nanoconjugate based on polymalic acid for tumor targeting [J]. *Chem Biol Interact*, 2008, 171(2):195-203
- [13] Cammas S, Renard I, Langlois V R, et al. Poly(beta -malic acid) obtaining high molecular weights by improvement of the synthesis route[J]. *Polymer*, 1996, 37(18):4215-4220
- [14] Guerin P, Vert M, Braud C, et al. Optically active poly (beta-malic-acid) [J]. *Polymer Bulletin*, 1985, 14(2):187-192
- [15] Johns D B, Lenz R W, Vert M. Poly(Malic Acid) Part I—Preparation and Polymerization of Benzyl Malolactonate[J]. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1986, 1(1):47-60
- [16] 张海涛,李飞,范黎,等. 叶酸介导的普鲁兰多糖-阿霉素聚合物前药的制备及生物学性能初探 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(9): 1634-1638
- Zhang Hai-tao, Li Fei, Fan Li, et al. Prodrug of Folate-mediated Pullulan-doxorubicin Polymer: Preparation, Characterization and Biological Evaluation[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(9):1634-1638
- [17] Yang L, Zhao C, Liu Y. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Conjugates of Camptothecin and 5-Fluorouracil as Cytotoxic Agents [J]. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2011, 22(2):308-318
- [18] Allen T M, Cullis P R. Drug delivery systems: entering the mainstream[J]. *Science*, 2004, 303(5665):1818-1822
- [19] Ding Y, Zhang P, Tang X, et al. PEG prodrug of gambogic acid: Amino acid and dipeptide spacer effects[J]. *Polymer*, 2012, 53(8):1694-1702
- [20] Zhao Y, Wei W, Su Z, et al. Poly (ethylene glycol) prodrug for anthracyclines via N-Mannich base linker: Design, synthesis and biological evaluation [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 379 (1):90-99
- [21] Kawano K, Watanabe M, Yamamoto T, et al. Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long-circulating polymeric micelles[J]. *Journal of Controlled Release*, 2006, 112(3):329-332
- [22] Caiolfa V R, Zamai M, Fiorino A, et al. Polymer-bound camptothecin: initial biodistribution and antitumor activity studies [J]. *Journal of Controlled Release*, 2000, 65(1-2):105-119
- [23] 戴华青,马丽芳,郭丽,等. PEG 化聚酰胺-胺树状大分子的合成及其作为喜树碱药物载体的研究[J]. *华西药理学杂志*, 2009, 24(2):115-117
- Dai H, Ma L, Guo L, et al. Synthesis of PEGylated PAM AM dendrimer as a camptothecin carrier [J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 24(2):115-117
- [24] Fan L, Wu H, Zhang H, et al. Antitumor drug Paclitaxel-loaded pH-sensitive nanoparticles targeting tumor extracellular pH[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77(4):773-778
- [25] Stubbs M, McSheehy P M, Griffiths J R, et al. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment [J]. *Mol Med Today*, 2000, 6(1):15-19
- [26] Murphy R F, Powers S, Cantor C R. Endosome pH measured in single cells by dual fluorescence flow cytometry: rapid acidification of insulin to pH6[J]. *J Cell Biol*, 1984, 98(5):1757-1762
- [27] Zhang H, Li F, Yi J, et al. Folate-decorated maleilated pullulan-doxorubicin conjugate for active tumor-targeted drug delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 42(5):517-526

(上接第 3272 页)

- [9] Marchal J, Kambouchner M, Tazi A, et al. Expression of apoptosis-regulatory proteins in lesions of pulmonary langerhans cell histiocytosis[J]. *Histopathology*, 2004, 45(1):20-28
- [10] Margo C E, Goldman DR. Langerhans cell histiocytosis[J]. *Surv Ophthalmol*, 2008, 53(4):332-358
- [11] Ma Li-juan, Shi Xiao-dong, Wang Tian-you, et al. Langerhans cell histiocytosis of the traditional sub-type classification and Lavin-Osband and its clinical significance [J]. *Chinese Journal of Pediatrics*, 2004, 42 (1): 58-61(In Chinese)
- [12] Cristina M, Vanesa G, Blanca G, et al. Langerhasn cell histiocytosis: Literature review and descriptive analysis of oral manifestations[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2009, 14(5):222-228
- [13] Gasent Blesa J M, Alberola C V, Solano V C, et al. Langerhans cell histiocytosis[J]. *Clin Transl Oncol*, 2008, 10(11):688-696
- [14] Wang Xi-ge. The Gehan organization of small Kenjiro cell hyperplasia in 38 cases of clinical analysis [J]. *Chinese Pediatric Emergency Medicine*, 2006(05):434-437(In Chinese)
- [15] Jia Xin-lei. Congenital Langerhans cell histiocytic hyperplasia in one case [J]. *Chinese Journal of Neonatology*, 2007(01):28-33(In Chinese)
- [16] Liu Qing-ling. Langerhans cell histiocytosis [J]. *Pediatric Hematology and Oncology*, 2008(06):512-515