

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.007

海藻酸钠漂浮微囊的制备以及载药应用研究*

李诚博 程笑晨 刘晨光[△]

(中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266003)

摘要 目的:本文研究了一种海藻酸钠漂浮微囊的制备方法用以实现胃部持续给药。方法:采用微胶囊发生器制备海藻酸钠漂浮微囊,壁材为海藻酸钠,芯材为食用油的漂浮微囊,衡量不同的制备参数对微囊的理化特性影响;采用克拉霉素作为模型脂溶性药物,测量漂浮药物递送系统的控制释放性质、以及微囊载药特性和小鼠体内漂浮验证。结果:成功制备出了具有漂浮特性的海藻酸钠微囊,其中泵送速度对微囊性质的影响最大。制备出的微囊具有低细胞毒性,可以实现90%的药物包埋率。此外,微囊可以在小鼠的胃中保存超过6小时,具有良好的漂浮特性。结论:海藻酸钠漂浮微囊是一种有效的胃部药物递送系统,可明显延长药物在胃部的滞留时间。

关键词:海藻酸钠;漂浮微囊;药物递送系统;包埋

中图分类号:Q-33;Q503;R918 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)10-1833-09

Preparation and Drug Loading Application of Sodium Alginate Floating Microcapsules*

LI Cheng-bo, CHENG Xiao-chen, LIU Chen-guang[△]

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, 266003, China)

ABSTRACT Objective: In this paper, a sodium alginate floating microcapsules was prepared to achieve the goal of sustained administration in the stomach. **Methods:** The microcapsules, which had the outer layer of alginate and inner layer of oil, were prepared by a kind of microcapsule generator. The effects of different preparation parameters on the physical and chemical properties of microcapsules were investigated. Moreover, the controlled release properties of floating drug delivery system using clarithromycin as model liposoluble drugs was determined. In the end, the drug loading efficiency and floating test were also carried out. **Results:** The alginate microcapsules with floating characteristics were successfully prepared, and the pumping speed had the greatest effect on the microcapsule properties. The prepared microcapsules can achieve 90% drug efficiency which has low cytotoxicity. In addition, the microcapsules can be stored in the stomach of mice for more than 6 hours which meant great floating properties. **Conclusions:** Sodium alginate floating microcapsules are effective gastric drug delivery system that can significantly prolong the retention time of the drug in the stomach.

Key words: Alginate; Floating microcapsule; Drug delivery system, Encapsulation

Chinese Library Classification(CLC): Q-33; Q503; R918 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)10-1833-09

前言

口服药物递送的途径目前应用相当广泛,这是因为其治疗成本低并且易于给药,同时提高患者依从性,即对医嘱的服从态度。但是在胃中进行药物递送时,常规的口服药物递送系统有许多局限性,例如药物可以在胃肠环境中部分吸收和降解,导致药物的快速排空和差的生物利用度^[1-3]。

近年来,已有文献报道改性形状系统^[4]、磁性系统^[5]、高密度系统^[6]、粘膜粘附系统^[7,8]、肿胀^[9,10]膨胀系统^[11]以及漂浮系统^[12-14]等经延长胃滞留的方法。漂浮药物递送系统是整体密度小于胃液密度的一种系统^[15,16],这些载体可以在胃中保持长时间漂浮而不受胃排空速率的影响。同时,漂浮药物递送系统被认为是

最有利的,因为它不干扰胃肠道的生理活性,也不会因为剂型的暂时增多而被去除。已有报道表明漂浮剂型可以显著延长胃滞留时间^[17,18],改善生物利用度^[19,20]。因此,漂浮药物递送系统是适合口服控释的剂型^[21]。

微包埋技术是一种将材料涂覆或包埋在另一种物质形成保护壳或壁的技术^[22]。微包埋作为一种保护技术,可以封装一些反应性、敏感性或挥发性物质,形成纳米到微米大小的不同尺寸的微囊^[23],可以有效地将核心材料与周围环境隔离,避免其挥发和变质^[24,25]。该技术已被广泛应用于营养保健工业,食品^[26-31]、化妆品^[32]、农业^[33-35]和制药^[36-41]行业中。然而,当内部被包埋材料为油性或者脂溶性时,最常见的是在食品工业领域将虾油^[42]、鱼油^[36,43]和种子油^[44,45]的微包埋。在制药工业中很少使用,只

* 基金项目:山东省科技发展计划资助项目(2015GGE29028)

作者简介:李诚博(1988-),博士研究生,主要研究方向:生物化学与分子生物学, E-mail: lichengbo88@sina.com

△ 通讯作者:刘晨光(1968-),博士生导师,教授,主要研究方向:生物化学与分子生物学, E-mail: profliucg@163.com, 电话:0532-83032102

(收稿日期:2017-07-28 接受日期:2017-08-23)

有一小部分蛋白质被采用。

海藻酸钠是一种天然的阴离子多糖,由于其良好的生物相容性,在温和条件下的凝胶化和作为相对惰性的基质已广泛用作蛋白质和活细胞的包埋物^[46,47]。克拉霉素(CAM)是一种大环内酯,口服吸收,广谱抗生素。CAM在体内单一疗法中根除幽门螺杆菌的速率是最高的,尽管它在胃酸的低pH下不稳定并快速降解^[9]。包含CAM的几种片剂和儿科制剂已经在整个世界得到的大规模应用^[48]。但它还没有报道CAM被封装在微胶囊中。

在本研究中,通过使用包埋装置制备海藻酸钠作为包埋物质,食用油作为内核的漂浮微囊。同时,评价了制备参数对漂浮微囊性质的影响,对溶胀比,体外浮力和药物包埋效率的物理化学特性也进行了检测。此外,我们采用CAM作为模型脂溶性药物,以测量漂浮药物递送系统的控制释放性质。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

包埋剂(购自青岛明月海藻公司)采用一种从褐藻中提取的低分子量海藻酸钠(在25℃下2%溶液的粘度,100-300 cps)。食用油购自金龙鱼公司(北京,中国)。国药公司购买用于固化海藻酸钠的无水氯化钙(分析纯),CAM购自太阳生物科技有限公司(北京,中国)。使用的微胶囊发生器(步琦,瑞士)制备漂浮药物递送系统。并且使用高效液相色谱(HPLC)(安捷伦科技,美国)来研究药物的释放规律(色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶,流动相为磷酸盐缓冲液-乙腈600:400,检测波长210 nm,温度为45℃)。通过光学显微镜(尼康,日本)和扫描电子显微镜(佳能,日本)观察图像。通过离心机(贝克曼考尔特,美国)和冻干器(马丁,德国)分别实现离心和冻干的进程。用纯净水净化系统产生蒸馏水以制备所有溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 采用微胶囊发生仪制备海藻酸钠微球 使用配备有内/外(150 μm/300 μm)同心喷嘴的微胶囊发生器B-395Pro来制备微囊。同时配备60 mL注射器和气压机来产生进样的推动力。整个递送系统使用海藻酸钠溶液作为壳形成相,并且将食用油(混有药物)用作内核形成相。并在液流下放置5%(w/v)氯化钙以使微胶囊固化。以可变的海藻酸钠进料流速和内核食用油流速来制备不同条件下的微胶囊。改变振幅、频率、高度、同心喷嘴的类型以及海藻酸钠的种类以优化微胶囊的制备方法和性质。制备后,将微胶囊冷冻干燥并在干燥条件下储存。

1.2.2 微囊的性质检测 在光学显微镜下观察微囊形状和表面形态,通过扫描电子显微镜观察精细结构。使用分析软件测量和计算粒径,圆度和核壳的比率。

同时研究微囊在不同pH下的溶胀度。将制备的微囊浸入pH 1.2和pH 7.4的两种缓冲液中,维持温度在37℃^[49,50]。在称重之前,使用滤纸除去微胶囊的表面多余水分。实验重复三次。然后使用以下公式(式1-1)确定溶胀率(%):

$$\text{溶胀率}(\%) = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \quad \text{式(1-1)}$$

其中W₀是微胶囊的初始重量,W_t是在足够长的时间t内溶胀的重量。为了使微球达到其最高的溶胀能力,在称重W₀后

马上将它们浸入新鲜的缓冲溶液中。

微囊的体外浮力通过目测观察模拟胃液中的漂浮状况进行初始评估^[51],微胶囊的浮力通过公式1-2^[52]计算。将漂浮微囊(50 mg)置于含有吐温20(0.02%,w/v)的模拟胃液(pH=1.2,100 mL)中,使用磁力搅拌器(转速:100 rpm)搅拌。12小时后,将漂浮起来的微囊收集,同时将没有漂浮沉淀下去的微囊收集。将两种类型的颗粒干燥并称重。

$$\text{浮力}(\%) = \frac{W_f}{W_f + W_s} \times 100 \quad \text{式(1-2)}$$

其中W_f和W_s分别是漂浮和沉淀的微囊的相应重量。

此外,可以使用以下公式1-3确定芯部的体积比:

$$\text{体积比}(\%) = \frac{V_0}{V_a} \times 100 = \frac{r_0^3}{r_a^3} \times 100 \quad \text{式(1-3)}$$

其中V₀和r₀是油芯的相应体积和半径,并且V_a和r_a是整个微胶囊的体积和半径。

1.2.3 药物包埋率 为了确定包埋在海藻酸钠微囊内的CAM的量,将100 mg干微球分散在100 mL柠檬酸钠溶液(3%,w/w)中,并用2M NaOH将分散体的pH调节至7.8。然后将样品保存在37℃环境中,同时在130 rpm下搅拌24小时^[53]。选择柠檬酸钠溶液是因为海藻酸钠基质将在pH 7.8的该溶液中完全溶解^[54]。在15000×g离心10 min后,通过在210 nm处的HPLC测量上清液中的CAM的量。海藻酸钠微球对CAM的包埋率采用式1-4计算:

$$\text{EE}(\%) = \left(\frac{\text{从微胶囊释放的CAM的含量}}{\text{添加到溶液中的总CAM含量}} \right) \times 100 \quad \text{式(1-4)}$$

其中EE(%)表示包埋效率百分比。

1.2.4 体外药物释放及释放动力学研究 采用Miyazaki等人^[55]所述方法,稍作修改后测定从微胶囊中释放的CAM。所用的溶解介质是500 mL 0.01M HCl(pH=2.0),温度保持在37±0.2℃。在每个时间间隔,精确取出并测量溶出介质的样品浓度,随后用预热(37℃)的新鲜介质补充。以预定的时间间隔取出样品,并用NaOH(0.05M)溶液中和,然后使用pH为5.5的乙腈水溶液和磷酸盐缓冲溶液(40:60,v/v)组成的流动相通过高效液相色谱法(HPLC)检测CAM的浓度。检测在210 nm和45℃下进行HPLC^[56]。实验进行三次重复。

1.2.5 细胞毒性检测 如前所述,通过MTT方法测定包埋CAM的微胶囊对细胞生长的影响^[57]。将Caco-2细胞(购自中科院上海细胞库)在6孔板中培养并用不同量的微胶囊刺激。在24,48和72小时后,将MTT加入每个孔,终浓度为0.5 mg/mL,进一步温育4小时。同时采用无血清培养基用作阳性对照,十二烷基磺酸钠(SDS)用作阴性对照。在490 nm处测量OD值。

1.2.6 体内漂浮检测 用优化的漂浮微囊处理重量为180-200 g的健康白化小鼠。该研究由机构动物伦理委员会批准。将动物单独圈养在聚丙烯笼中并保持在标准条件下(12小时光照和12 h黑暗循环;25-30℃)。研究期间,动物禁食不断水。用罗丹明B标记食用油,并按照类似的方法制备优化的微囊。小鼠灌胃针的类型为16#,剃毛机用于脱毛,戊巴比妥钠用于麻醉。在不同的时间间隔,采用活体成像用于监测微胶囊在胃部的漂

浮行为。

2 结果

2.1 海藻酸钠漂浮微球制备

在本研究的初步阶段,采用经典方法(每次改变一个独立因素)来定义实验参数。实际上,选择这种方法是为了评价哪个(哪些)因素可以在颗粒大小、圆整度和尺寸分布方面,更直接地影响海藻酸钠微囊的性质。

2.1.1 进样速度的影响 根据该实验方法,一次只改变一个实验参数,而所有其他参数保持恒定。微胶囊能否漂浮是由核心部分所决定的。微囊的内部食用油核心的比例可以通过泵送速度来确定,因为它可以控制食用油的比例。我们可以看到表1的结果,除了泵样速度外,所有的参数保持不变。在泵送速度为0.01 mL/min 至 1.40 mL/min 的范围内,微胶囊从底部逐渐漂浮到上部范围。当泵升至 0.7 mL/min 时,几乎所有的微胶囊都可以漂浮在液面上。

表1 泵速对海藻酸钠漂浮微囊的影响分析

Table 1 The analysis of the pump speed on microcapsule floating characteristics (150 μ m/300 μ m)

Pump (mL/min)	Particle size (μ m)	Roundness	Buoyancy (%)	Volume ratio(%)
0.01	641.43 $\pm$ 49.38*	2.73 $\pm$ 0.34	-	-
0.1	528.40 $\pm$ 17.05	0.71 $\pm$ 0.18	-	-
0.2	589.21 $\pm$ 32.44	0.70 $\pm$ 0.22	-	-
0.3	577.17 $\pm$ 21.53	0.61 $\pm$ 0.12	-	-
0.4	518.42 $\pm$ 26.34	1.12 $\pm$ 0.26	19.3 $\pm$ 7.1	3.20 $\pm$ 1.12
0.5	539.73 $\pm$ 28.50	0.65 $\pm$ 0.11	24.5 $\pm$ 4.2	8.74 $\pm$ 1.63
0.6	531.72 $\pm$ 24.42	0.53 $\pm$ 0.12	28.4 $\pm$ 5.2	10.57 $\pm$ 1.25
0.7	540.15 $\pm$ 30.28	0.54 $\pm$ 0.08	51.0 $\pm$ 6.2	14.78 $\pm$ 1.84
0.8	502.12 $\pm$ 18.20	0.44 $\pm$ 0.07	63.4 $\pm$ 9.9	22.40 $\pm$ 1.45
0.9	635.41 $\pm$ 48.78	0.79 $\pm$ 0.18	44.8 $\pm$ 7.9	21.18 $\pm$ 1.81
1.0	519.32 $\pm$ 28.84	0.80 $\pm$ 0.23	60.7 $\pm$ 3.6	19.62 $\pm$ 2.04
1.1	510.03 $\pm$ 21.29*	0.53 $\pm$ 0.10	68.6 $\pm$ 9.0	25.62 $\pm$ 1.16
1.2	564.41 $\pm$ 34.63	0.61 $\pm$ 0.10	70.8 $\pm$ 8.8	23.92 $\pm$ 1.14
1.3	487.22 $\pm$ 23.22	0.59 $\pm$ 0.18	79.7 $\pm$ 9.3	37.18 $\pm$ 1.96
1.4	627.84 $\pm$ 34.16	1.22 $\pm$ 0.21	61.2 $\pm$ 5.2	26.98 $\pm$ 1.63

注:测试条件为:Alginate (w/v)=1.0%、Frequency=1500Hz、Amplitude=9 mm、Height = 160 mm; *P<0.05,代表粒径分散系数在较大及较小泵速下具有显著性差异。

Note: The test conditions are: Alginate (w/v) = 1.0%, Frequency= 1500 Hz, Amplitude= 9 mm, Height= 160 mm; * P<0.05, which means that the particle size dispersion coefficient is significant different at larger and smaller pump speed.

2.1.2 振动频率的影响 频率是根据海藻酸钠溶液的性质和喷嘴直径所计算的^[58]。在该研究中喷嘴的振动频率在 100 至 4000 Hz 之间变化,同时在 0.80 mL/min 的范围内研究油泵送速率。表2显示了这些参数的研究结果,频率的增加导致微囊粒度减小,并且圆整度更好,但是如果振动频率设置得太高(4000Hz),则在微胶囊中可检测到许多数量的微囊聚集。

2.1.3 振幅的影响 振动的幅度对微胶囊特性只有轻微的影响(表3)。当振幅为 1、2 和 3 mm 时,振幅较少导致液流的阻断力不够,因此微囊会形成聚结的形态,导致粒径的范围相当大,同时圆整度也很大。

2.1.4 高度的影响 相反,喷嘴和固化液之间的距离(范围为 80-160 mm)对形态有很大的影响(表4)。事实上,距离的增加导致微囊液滴在下落过程中因为重力的原因形成椭圆形,甚至产生拖尾现象。越近的高度,微胶囊粘在一起形成不可分离的基团的可能性越大。所以高度需要在合适范围内,实验表明

160 mm 比其他条件形成的微囊更好。

2.1.5 喷嘴孔径的影响 喷嘴的孔径在制备微胶囊中的效果相当大。表5显示了喷嘴直径对微囊的各种影响。可以清楚地发现,微胶囊的粒度大约是喷嘴直径的 2 倍。当外喷嘴为 300 μ m 时,粒径接近 600 μ m; 当其为 200 μ m 时,粒径约为 400 μ m。此外,粒径和圆整度具有一定程度的分散。

2.1.6 海藻酸钠浓度的影响 不同浓度的海藻酸钠溶液具有不同的粘度。浓度越高,凝胶越紧密。同时,凝胶的重量与海藻酸钠的浓度呈正相关。从表6可以看出,随着浓度的增加,同一条件下的浮力减小。这是因为整个体系重量增加导致微胶囊的密度增加,进而产生沉淀。

2.2 微囊的表征

2.2.1 微囊的外部形态观察 漂浮微囊的外部形态可以通过光学显微镜观察。从图1可以看出,当核心油部分足够大时,微囊可以实现漂浮。同时,图1(B)可以清楚地表明,油是完全封

装在微囊中的,并且微囊有良好的球形。图 1(C,D)是在扫描电 分占整个微胶囊的较高比例。
子显微镜(SEM)下观察微胶囊的中空结构。可以观察到中空部

表 2 不同频率下的微囊性质

Table 2 The characteristics of microcapsules in different frequency (150 μ m/300 μ m)

Frequency (Hz)	Particle size(μ m)	Roundness	Buoyancy(%)	Volume ratio(%)
100	634.22 $\pm$ 44.87	2.05 $\pm$ 0.54	67.7 $\pm$ 9.3	23.09 $\pm$ 1.42
500	640.03 $\pm$ 40.10	1.99 $\pm$ 0.46	67.5 $\pm$ 8.1	15.61 $\pm$ 1.13
1000	592.42 $\pm$ 40.53	1.60 $\pm$ 0.58	61.3 $\pm$ 6.2	18.46 $\pm$ 1.35
1500	534.83 $\pm$ 33.62	0.84 $\pm$ 0.29	75.0 $\pm$ 3.7	24.90 $\pm$ 1.68
2000	539.21 $\pm$ 18.99	0.49 $\pm$ 0.15	77.7 $\pm$ 3.4	28.40 $\pm$ 1.46
2500	511.32 $\pm$ 10.44	0.37 $\pm$ 0.10	71.5 $\pm$ 3.9	28.78 $\pm$ 1.97
3000	531.49 $\pm$ 17.70	0.29 $\pm$ 0.04	78.2 $\pm$ 9.6	32.89 $\pm$ 1.86
3500	545.82 $\pm$ 14.95	0.44 $\pm$ 0.09	64.9 $\pm$ 6.4	25.33 $\pm$ 1.65
4000	682.82 $\pm$ 45.50	1.94 $\pm$ 0.74	71.8 $\pm$ 8.0	22.30 $\pm$ 1.48

注:测试条件为:Alginate (w/v)=1.0%、Pump=0.9 mL/min、Amplitude=9 mm、Height = 160 mm。

Note: The test conditions are: Alginate (w/v) = 1.0%, Pump=0.9 mL/min, Amplitude= 9 mm, Height= 160 mm.

表 3 不同振幅条件下微囊性质

Table 3 The characteristics of microcapsules in different amplitude (150 μ m/300 μ m)

Amplitude (mm)	Particle size(μ m)	Roundness	Buoyancy(%)	Volume ratio(%)
1	700.57 $\pm$ 68.45	2.82 $\pm$ 0.95	52.0 $\pm$ 9.2	16.17 $\pm$ 1.63
2	558.68 $\pm$ 39.06	1.96 $\pm$ 0.71	65.7 $\pm$ 5.7	18.95 $\pm$ 1.76
3	556.61 $\pm$ 40.45	1.17 $\pm$ 0.49	60.9 $\pm$ 4.8	20.74 $\pm$ 2.13
4	510.55 $\pm$ 24.67	0.64 $\pm$ 0.14	70.7 $\pm$ 8.8	22.08 $\pm$ 1.87
5	498.34 $\pm$ 25.15	0.36 $\pm$ 0.16	68.4 $\pm$ 9.6	25.76 $\pm$ 2.15
6	494.06 $\pm$ 18.46	1.05 $\pm$ 0.18	74.8 $\pm$ 3.8	14.88 $\pm$ 1.15
7	474.09 $\pm$ 22.55	0.78 $\pm$ 0.20	69.4 $\pm$ 7.8	21.50 $\pm$ 2.03
8	476.15 $\pm$ 14.60	0.66 $\pm$ 0.15	80.1 $\pm$ 9.6	23.02 $\pm$ 1.97
9	460.17 $\pm$ 2.29	0.36 $\pm$ 0.08	73.1 $\pm$ 3.1	26.96 $\pm$ 1.35
10	503.17 $\pm$ 28.26	0.47 $\pm$ 0.07	69.3 $\pm$ 8.7	24.28 $\pm$ 1.32
11	560.22 $\pm$ 41.41	1.36 $\pm$ 0.60	68.6 $\pm$ 9.5	14.25 $\pm$ 1.62
12	481.05 $\pm$ 33.64	1.35 $\pm$ 0.64	61.2 $\pm$ 8.8	19.24 $\pm$ 1.41

注:测试条件为:Alginate (w/v)=1.0%、Frequency=1500Hz、Pump=0.9 mL/min、Height = 160 mm。

Note: The test conditions are: Alginate (w/v) = 1.0%, Pump=0.9 mL/min, Frequency=1500Hz, Height= 160 mm.

表 4 不同高度下漂浮微囊的性质

Table 4 The characteristics of microcapsules in different height (150 μ m/300 μ m)

Height (mm)	Particle size(μ m)	Roundness	Buoyancy (%)	Volume ratio(%)
160	502.10 $\pm$ 18.20	0.44 $\pm$ 0.07	81.2 $\pm$ 4.8	28.78 $\pm$ 1.48
150	708.73 $\pm$ 23.53	3.27 $\pm$ 0.24	56.8 $\pm$ 8.1	17.06 $\pm$ 1.23
140	764.87 $\pm$ 49.90	3.64 $\pm$ 0.53	56.2 $\pm$ 8.6	14.87 $\pm$ 1.67
130	706.27 $\pm$ 45.79	3.22 $\pm$ 0.47	66.1 $\pm$ 3.4	19.52 $\pm$ 1.63
120	529.64 $\pm$ 28.76	2.14 $\pm$ 0.44	69.4 $\pm$ 3.7	19.95 $\pm$ 1.38
110	643.35 $\pm$ 24.70	3.59 $\pm$ 0.30	68.0 $\pm$ 5.9	15.87 $\pm$ 1.39
100	642.86 $\pm$ 27.45	1.20 $\pm$ 0.31	75.1 $\pm$ 5.0	16.04 $\pm$ 1.71
90	635.03 $\pm$ 23.89	2.32 $\pm$ 0.63	75.8 $\pm$ 9.3	17.90 $\pm$ 1.66
80	572.53 $\pm$ 29.89	1.01 $\pm$ 0.63	71.1 $\pm$ 5.8	24.83 $\pm$ 1.25

注:测试条件为:Alginate (w/v)=1.0%、Pump=0.9mL/min、Frequency=1500Hz、Amplitude=9 mm

Note: The test conditions are: Alginate (w/v) = 1.0%, Pump=0.9 mL/min, Frequency=1500Hz, Amplitude=9 mm.

表 5 两种喷嘴孔径制备的漂浮微囊的特性

Table 5 The characteristics of microcapsules in two kinds of nozzles (150 μm /200 μm)

Pump (mL/min)	Particle size(μm)	Roundness	Buoyancy(%)	Volume ratio(%)
0.5	439.23 $\pm$ 56.93	2.56 $\pm$ 1.23	-	-
0.6	322.96 $\pm$ 16.18	0.33 $\pm$ 0.05	14.2 $\pm$ 2.9	7.30 $\pm$ 1.97
0.7	323.02 $\pm$ 16.43	0.42 $\pm$ 0.08	20.6 $\pm$ 2.2	11.04 $\pm$ 1.85
0.8	303.38 $\pm$ 10.95	0.34 $\pm$ 0.09	16.2 $\pm$ 3.8	8.39 $\pm$ 1.25
0.9	287.67 $\pm$ 8.34	0.33 $\pm$ 0.06	18.4 $\pm$ 2.7	13.78 $\pm$ 2.12
1.0	282.76 $\pm$ 7.75	0.29 $\pm$ 0.06	55.8 $\pm$ 5.1	17.04 $\pm$ 2.96
1.1	328.61 $\pm$ 16.04	0.42 $\pm$ 0.10	62.1 $\pm$ 8.1	19.57 $\pm$ 1.52
1.2	309.91 $\pm$ 11.42	0.34 $\pm$ 0.08	67.2 $\pm$ 7.7	19.89 $\pm$ 1.46
1.3	274.56 $\pm$ 6.97	0.39 $\pm$ 0.15	77.7 $\pm$ 6.6	20.25 $\pm$ 2.91
1.4	311.99 $\pm$ 15.51	0.32 $\pm$ 0.07	74.4 $\pm$ 6.7	27.68 $\pm$ 1.13
1.5	281.23 $\pm$ 5.87	0.28 $\pm$ 0.06	72.1 $\pm$ 7.6	26.41 $\pm$ 2.86
2.0	304.98 $\pm$ 9.71	0.38 $\pm$ 0.08	78.9 $\pm$ 6.9	31.44 $\pm$ 1.72
2.5	296.88 $\pm$ 8.47	0.30 $\pm$ 0.07	71.5 $\pm$ 8.4	32.09 $\pm$ 2.76
3.0	349.62 $\pm$ 12.02	0.54 $\pm$ 0.17	80.3 $\pm$ 3.2	41.19 $\pm$ 1.72

注:测试条件为:Alginate (w/v)=1.0%、Frequency=1500Hz、Amplitude=9 mm、Height=160 mm。

Note: The test conditions are: Alginate (w/v) = 1.0%, Frequency=1500Hz, Amplitude=9 mm, Height=160 mm.

表 6 不同海藻酸钠浓度对漂浮微囊的性质影响

Table 6 The characteristics of microcapsules in different sodium alginate of alginate (150 μm /200 μm)

Alginate (w/v, %)	Pump (mL/min)	Swelling ratio (%)	Buoyancy (%)
0.5	1.0	-	-
0.5	2.0	-	-
0.5	3.0	-	-
1.0	1.0	383.23 $\pm$ 35.6	78.7 $\pm$ 8.5
1.0	2.0	386.42 $\pm$ 31.0	77.7 $\pm$ 6.4
1.0	3.0	377.16 $\pm$ 24.3	80.6 $\pm$ 8.8
1.5	1.0	237.73 $\pm$ 28.3	19.6 $\pm$ 7.4
1.5	2.0	251.98 $\pm$ 36.7	69.2 $\pm$ 6.1
1.5	3.0	277.21 $\pm$ 22.3	98.7 $\pm$ 7.6
2.0	1.0	265.61 $\pm$ 26.5	18.8 $\pm$ 4.3
2.0	2.0	251.37 $\pm$ 31.7	47.1 $\pm$ 11.4
2.0	3.0	218.45 $\pm$ 20.4	73.5 $\pm$ 10.1

2.2.2 微囊的溶胀性 由于海藻酸钠聚合物链的亲水性质,凝胶所形成的网络能够吸收水,并且能够维持其整体结构而不受溶胀的损害^[59]。微囊在蒸馏水和 pH 为 1.5 的溶液中,溶胀比分别为 394.33% 和 395.81%。可以推断微囊的溶胀率主要由海藻酸钠决定,在海藻酸钠微囊受力极限范围内,溶胀性不会有明显变化。同时,该比率与其他海藻酸钠相比也是正常的^[60]。此外,与其他漂浮给药系统相比,溶胀率与其相似^[61]。

2.2.3 体外漂浮研究 微囊的漂浮能力与微囊的油含量直接相关^[62]。本实验研究了经过制备 12 小时后的漂浮微囊占整体所有微囊的百分比范围为 68.93%-81.41%。从结果来看,与其他类似研究之间的漂浮时间相比没有显著性差异^[52]。在胃中,微胶囊可以以连续方式保持漂浮,并且发现漂浮百分比随食用

油量的增加而增加。

2.3 药物包埋率

图 2 显示药物包埋率随着核心材料流速的增加变化,包埋率首先保持高的平衡状态,这是因为药物不饱和微胶囊可以保持高水平的药物负载。当达到饱和后,多余的材料将会流出,因此包埋率是逐渐降低的。

2.4 药物的体外释放及释放动力学

图 3 为药物的缓释研究,结果显示海藻酸钠的浓度越低,最终释放的药物总量越高。这是因为海藻酸钠浓度越高,形成微囊后的囊壁密度越大,药物穿透困难,导致药物释放量的减少^[63]。整体趋势为第一阶段表现为平缓释放,随后有一个释放突释,最后稳步增长。刚刚开始缓慢释放药物可能的原因是药

物通过海藻酸钠核心壁需要一定时间,所以开始缓慢释放^[64]。当所有空隙填满后,因为内外浓度差过大,会出现突释。随后因

为体系的稳定性药物基本按照恒定速率释放。

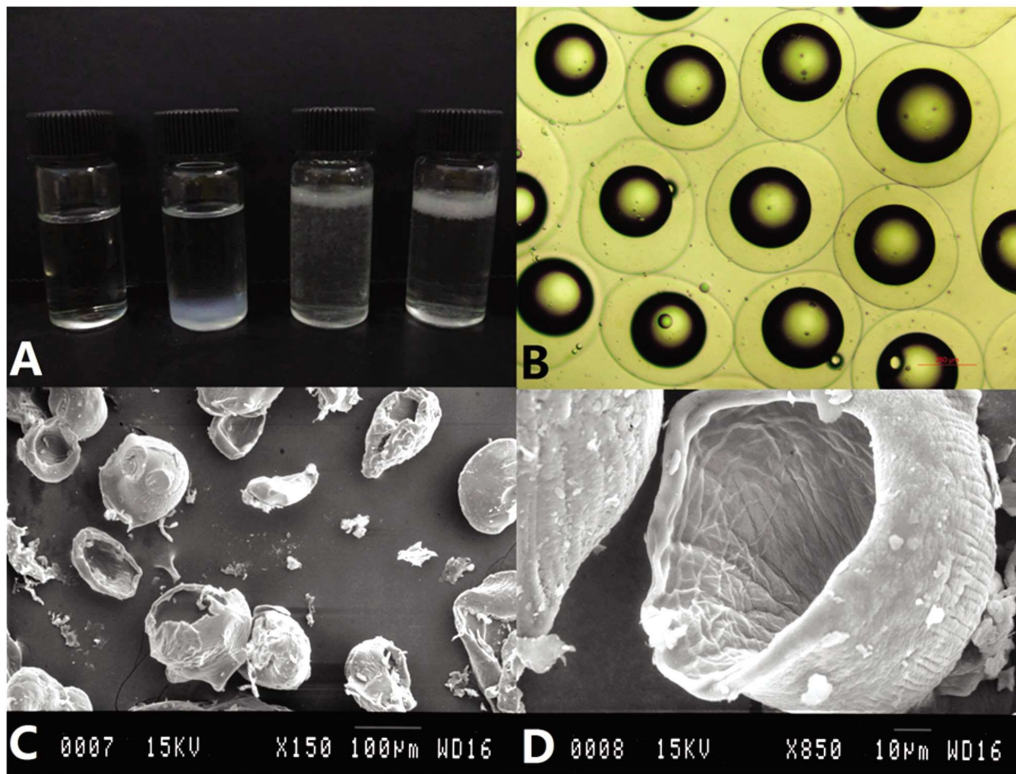


图1 微囊的宏观观察(A),光学显微镜视角(放大倍数 10× 10,比例尺代表 250 微米)(B)和电子扫描显微镜视角(C,D)

Fig.1 The macroscopic view (A), optical microscope view (10× 10, scale bar=250le) (B) and under SEM (C, D)

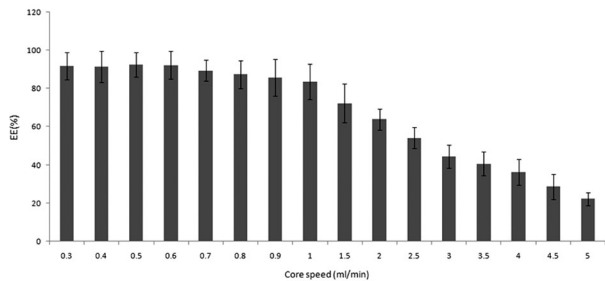


图2 不同核壳流速比条件下的包埋率

Fig.2 The entrapment efficiency in different core speed. (Shell speed remains 20mL/min)

为了进一步研究药物在漂浮微囊的释放机制,我们进行了药物的释放动力学研究。从图4可以看出,将体外释放数据的优化配方拟合到各种数学模型,如零阶、一阶、Higuchi 和 Peppas 动力学模型,从而选出最符合的释放动力。在所有的结果中,对于 Peppas 模型获得最高回归(0.982),随后是一级动力学(0.975)和 Higuchi(0.953)。因此该漂浮微囊可以通过 Peppas 方程研究释放机制^[65,66]。该释放机制是较复杂的非零阶和一阶模型。

2.5 细胞毒性实验

微胶囊的细胞毒性结果见图5。可以观察到,通过添加包埋有 CAM 的微囊培养后细胞活性几乎没有下降。阳性对照显示低细胞毒性。与未处理的细胞相比,当加入任一微球时,光学显微镜观察显示细胞形态没有变化。另一方面,阴性对照为暴露于 SDS 的细胞显示出广泛的细胞裂解和空泡化,只有 25% 的细胞是活性的。

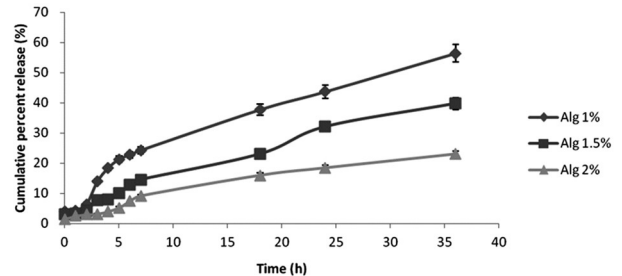


图3 不同海藻酸钠浓度下的 CAM 释放曲线

Fig.3 The drug release curve of clarithromycin in a different kind of alginate

2.6 体内漂浮研究

用优化条件制备的漂浮微囊在活体成像方法中显示出良好的体外漂浮能力。在 0 至 6 小时获得的结果见图6,结果表明制备的漂浮微囊在胃部可以漂浮超过 6 小时。因此,微胶囊可以通过延长胃滞留时间来增强药物释放以提高疗效和减少副作用。

3 讨论

依据不同的制备参数制备微囊,发现泵速是影响微囊特性的主要因素。随着进样速度的增加,越来越多的油分散在溶液中,并没有被包埋进去,因此泵送速度并不是越快越好。另外,所有样品的粒度具有很小的变化,但是标准偏差具有大的差异变化($P < 0.05$)。较小和较大的速度有大的标准偏差,特别是小的速度条件下。这是因为海藻酸钠液流不足,同时受到内部喷

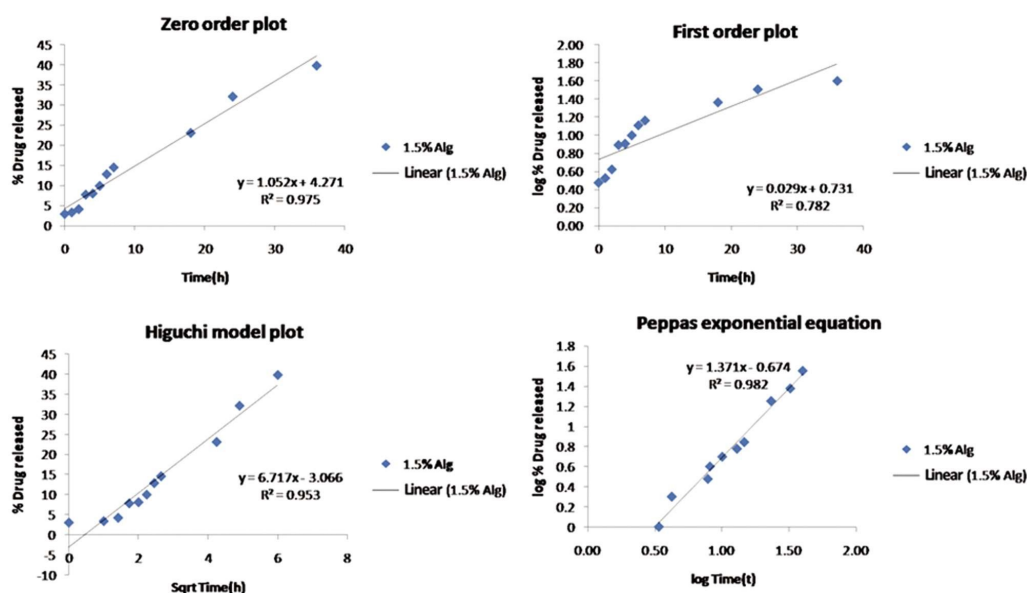


图4 释放动力曲线图(Q为单位时间释放的药物质量)

Fig.4 The release kinetics plots(Q = amount of drug released at different time (mg).)

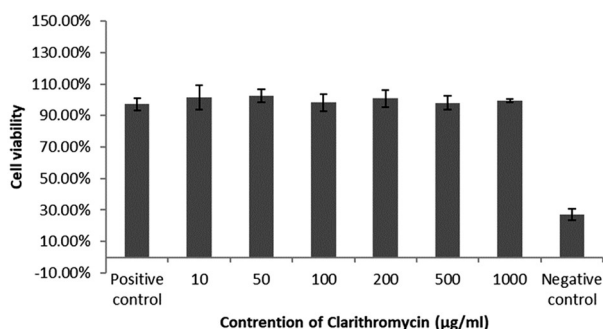


图5 包埋不同浓度 CAM 微囊的细胞毒性

Fig.5 Cytotoxicity of different concentrations of clarithromycin microcapsules

嘴流出的食用油的影响,使整体液流出现流动不流畅。更大的速度意味着油流影响海藻酸钠流动以形成球形微胶囊。当速度

为0.8 mL/min 时,圆整度为 0.44,较小的圆整度意味着更好的球形,因此在这种条件下所有的微胶囊都具有良好的球形。当泵送速度缓慢时,浮力与体积比密切相关,油芯部分占据整体的比例增加可以降低整个微胶囊的密度。因此,随着速度的提高,微胶囊开始浮动,当泵送速度为 0.7 mL/min 时,一半的微胶囊可以保持浮动 12 小时,这意味着微胶囊可以实现漂浮的目的。但随着泵送速度的增加,浮力有一点变化,部分油不会被包裹,从而出现漏油现象,将会产生多余的浪费。

将 1500 Hz 和 3000 Hz 两种频率相比,前者具有有限的粒度,而后的圆整度更好。但是两者的圆整度不存在较大的差距,所以可以将频率设置为 1500 Hz 作为微胶囊的制备条件。同时考虑到粒径、浮力和体积比,发现所有的结果是相似的。因此,频率对微胶囊的主要特性几乎没有影响。

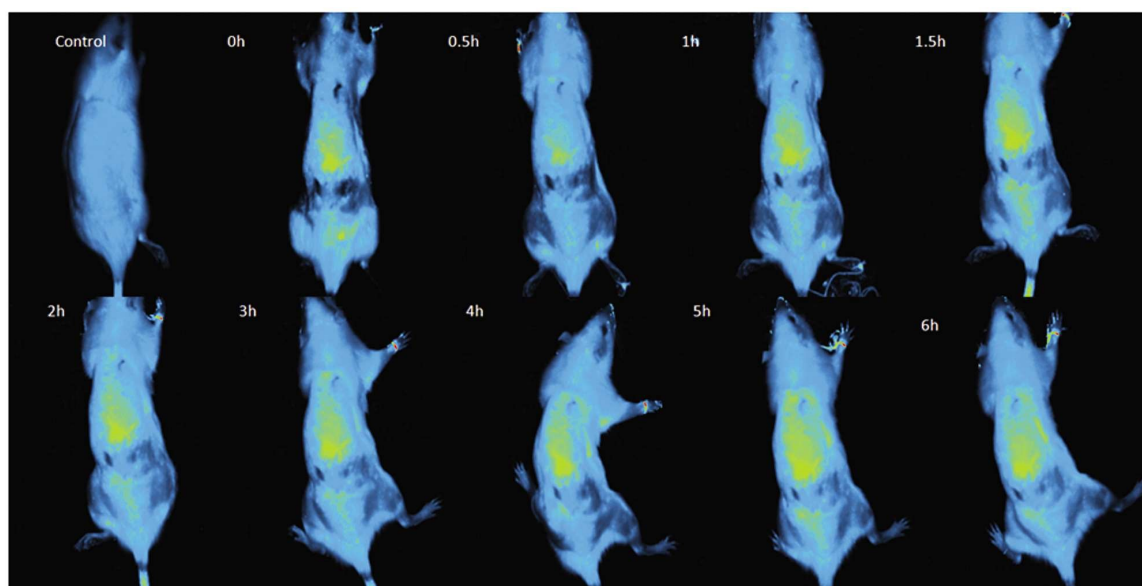


图6 不同时间间隔下小鼠胃部的活体成像图

Fig.6 Optical imaging graphs in the stomach of the rat in different time intervals

当振幅足够大时,可以保证每次都会将液流阻断,所以之后形成的差异很小。当振幅为 9 mm 时,所有数据都是稳定的并且平行的。当其足够大时,振幅对微胶囊的主要特征几乎没有影响。因此,在后续的实验中振幅设置为 9 mm。

另外,当高度为 160 mm 时,微胶囊被良好地展开,但微胶囊的主要特性几乎没有变化。喷嘴孔径小的制备微囊属性较好,原因可能是喷嘴越小,液体流动越容易切断。因此,由较小直径的喷嘴制成的微胶囊具有更好的球形。

溶胀性结果表明微胶囊在酸性环境中的形状和结构没有很大变化,因此溶胀比几乎相同。但是当微胶囊处于碱性环境中,当 pH 值为 7.4 时,所有的微胶囊都发生了降解,因此微胶囊在碱性溶液中没有溶胀比。这意味着微胶囊只存在于胃部及胃部之前。

微囊的药物包埋率与食用油的包埋比例密切相关。当食用油基本都包埋到微囊中时,药物包埋率很高。因此要在保证漂浮的基础上,减少多余食用油的流出,可以实现较高的药物包埋率。

一般情况下胃部排空时间为 4-6 小时,漂浮微囊可以在胃部存留至少 6 个小时,表明在强酸的环境下微囊可以保持稳定,从而实现药物的缓释,起到良好的治疗作用。

4 结论

在该研究中,实现了使用包埋装置制备海藻酸钠漂浮微囊。这种微胶囊属于一类漂浮药物递送系统。食用油的核心部分使微胶囊具有比胃液低的密度以实现漂浮的目标。微胶囊的制备受许多参数影响,其中泵送速度是最有影响力的因素。通过最佳参数制备的微胶囊具有高溶胀比,浮力和药物包埋效率。此外,释放动力学研究表明它是一个复杂的系统。同时,通过在小鼠体内的漂浮研究,发现这种海藻酸钠漂浮微囊的体内漂浮效率优异,并且微胶囊在小鼠胃中保持更长的时间,可以满足持续给药的目的。以上研究结果表明海藻酸钠漂浮药物递送系统是延长药物释放的有效方式。

参考文献(References)

- [1] Hoffman A. Pharmacodynamic aspects of sustained release preparations[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 33(3): 185-199
- [2] Pawar V K, Kansal S, Garg G, et al. Gastroretentive dosage forms: a review with special emphasis on floating drug delivery systems[J]. *Drug Deliv*, 2011, 18(2): 97-110
- [3] Streubel A, Siepmann J, Bodmeier R. Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 6(5): 501-508
- [4] Bardonnet P L, Faivre V, Pugh W J, et al. Gastroretentive dosage forms: overview and special case of *Helicobacter pylori* [J]. *J Control Release*, 2006, 111(1-2): 1-18
- [5] Fujimori J. Effect of magnetically controlled gastric residence of sustained release tablets on bioavailability of acetaminophen [J]. *Int J Pharm*, 1995, 119(1): 47-55
- [6] Rouge N, Allemann E, Gex-Fabry M, et al. Comparative pharmacokinetic study of a floating multiple-unit capsule, a high-density multiple-unit capsule and an immediate-release tablet containing 25 mg atenolol[J]. *Pharm Acta Helv*, 1998, 73(2): 81-87
- [7] Bravo-Osuna I, Vauthier C, Farabollini A, et al. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly (isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(13): 2233-2243
- [8] Dhaliwal S, Jain S, Singh H P, et al. Mucoadhesive microspheres for gastroretentive delivery of acyclovir: in vitro and in vivo evaluation [J]. *AAPS J*, 2008, 10(2): 322-330
- [9] Chen J, Blevins W E, Park H, et al. Gastric retention properties of superporous hydrogel composites [J]. *J Control Release*, 2000, 64(1-3): 39-51
- [10] Shalaby W S, Blevins W E, Park K. In vitro and in vivo studies of enzyme-digestible hydrogels for oral drug delivery[J]. *J Control Release*, 1992, 19(1-3): 131-144
- [11] Klausner E A, Lavy E, Friedman M, et al. Expandable gastroretentive dosage forms[J]. *J Control Release*, 2003, 90(2): 143-162
- [12] Atyabi F, Sharma H L, Mohammad H, et al. Controlled drug release from coated floating ion exchange resin beads [J]. *J Control Release*, 1996, 42(1): 25-28
- [13] Streubel A, Siepmann J, Bodmeier R. Floating microparticles based on low density foam powder[J]. *Int J Pharm*, 2002, 241(2): 279-292
- [14] Narang N. An updated review on: floating drug delivery system (FDDS)[J]. *Int J Appl Pharm*, 2011, 3(1): 1-7
- [15] Ozdemir N, Ordu S, Ozkan Y. Studies of floating dosage forms of furosemide: in vitro and in vivo evaluations of bilayer tablet formulations[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2000, 26(8): 857-866
- [16] Rahman Z, Ali M, Khar R. Design and evaluation of bilayer floating tablets of captopril[J]. *Acta Pharm*, 2006, 56(1): 49-57
- [17] Baumgartner S, Kristl J, Vrecer F, et al. Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time [J]. *Int J Pharm*, 2000, 195(1-2): 125-135
- [18] Iannuccelli V, Coppi G, Sansone R, et al. Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence. Part II. In vivo evaluation [J]. *Int J Pharm*, 1998, 174(1-2): 55-62
- [19] Abouelatta S M, Aboelwafa A A, Khalil R M, et al. Floating lipid beads for the improvement of bioavailability of poorly soluble basic drugs: in-vitro optimization and in-vivo performance in humans[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 89: 82-92
- [20] Li Z, Xu H, Li S, et al. A novel gastro-floating multiparticulate system for dipyrindamole (DIP) based on a porous and low-density matrix core: in vitro and in vivo evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2014, 461(1-2): 540-548
- [21] Singh B N, Kim K H. Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention [J]. *J Control Release*, 2000, 63(3): 235-259
- [22] Madene A, Jacquot M, Scher J, et al. Flavour encapsulation and controlled release - a review[J]. *Int J Food Sci Tech*, 2006, 41(1): 1-21
- [23] Su J, Wang X, Dong H. Influence of temperature on the deformation behaviors of melamine-formaldehyde microcapsules containing phase change material[J]. *Mater Lett*, 2012, 84: 158-161
- [24] Khakzad F, Alinejad Z, Shirin-Abadi A R, et al. Optimization of parameters in preparation of PCM microcapsules based on melamine formaldehyde through dispersion polymerization [J]. *Colloid Polym Sci*, 2014, 292(2): 355-368
- [25] Blaiszik B J, Caruso M M, McIlroy D A, et al. Microcapsules filled

- with reactive solutions for self-healing materials [J]. *Polymer*, 2009, 50(4): 990-997
- [26] Arshady R. Microcapsules for food[J]. *J Microencapsul*, 1993, 10(4): 413
- [27] Desai K, Park H J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients[J]. *Dry Technol*, 2005, 23(7): 1361-1394
- [28] Ezhilarasi P N, Karthik P, Chhanwal N, et al. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review[J]. *Food Bio-process Tech*, 2013, 6(3): 628-647
- [29] Onwulata C I. Encapsulation of new active ingredients [J]. *Annu Rev Food SciTechnol*, 2012, 3(1): 183-202
- [30] Rokka S, Rantamaki P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications[J]. *Eur Food Res Technol*, 2010, 231(1): 1-12
- [31] Shahidi F, Han X Q. Encapsulation of food ingredients [J]. *Crit Rev Food SciNutr*, 1993, 33(6): 501-547
- [32] Ammala A. Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets[J]. *Int J CosmetSci*, 2013, 35(2): 113-124
- [33] Hack B, Egger H, Uhlemann J, et al. Advanced Agrochemical Formulations through Encapsulation Strategies? [J]. *ChemieIngenieur Technik*, 2012, 84(3): 223-234
- [34] Sopena F, Maqueda C, Morillo E. Controlled release formulations of herbicides based on micro-encapsulation [J]. *Ciencia e Investigación Agraria*, 2009, 36(1): 27-42
- [35] Tsuji K. Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety[J]. *J Microencapsul*, 2001, 18(2): 137-147
- [36] De Geest B G, De Koker S, Sukhorukov G B, et al. Polyelectrolyte microcapsules for biomedical applications[J]. *Soft Matter*, 2009, 5(2): 282-291
- [37] Discher D E. Polymer Vesicles [J]. *Science*, 2002, 297 (5583): 967-973
- [38] Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(1): 113-131
- [39] Barar J, Aghanejad A, Fathi M, et al. Advanced drug delivery and targeting technologies for the ocular diseases[J]. *Bioimpacts*, 2016, 6(1): 49-67
- [40] Tong W, Gao C. Multilayer microcapsules with tailored structures for bio-related applications[J]. *J Mater Chem*, 2008, 18(32): 3799
- [41] Youan B B, Jackson T L, Dickens L, et al. Protein release profiles and morphology of biodegradable microcapsules containing an oily core[J]. *J Control Release*, 2001, 76(3): 313-326
- [42] Montero P, Calvo M M, Gó mez-Guillén M C, et al. Microcapsules containing astaxanthin from shrimp waste as potential food coloring and functional ingredient: Characterization, stability, and bioaccessibility[J]. *LWT-Food SciTechnol*, 2016, 70: 229-236
- [43] Kosaraju S L, Weerakkody R, Augustin M A. In-vitro evaluation of hydrocolloid-based encapsulated fish oil[J]. *Food Hydrocoll*, 2009, 23 (5): 1413-1419
- [44] Souza J M, Caldas A L, Tohidi S D, et al. Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil [J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2014, 24(6): 691-698
- [45] Yang X, Gao N, Hu L, et al. Development and evaluation of novel microcapsules containing poppy-seed oil using complex coacervation [J]. *J Food Eng*, 2015, 161: 87-93
- [46] Moebus K, Siepmann J, Bodmeier R. Novel preparation techniques for alginate-polyoxamer microparticles controlling protein release on mucosal surfaces[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45(3): 358-366
- [47] Smidsr D O, Skj K-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells[J]. *Trends Biotechnol*, 1990, 8(3): 71
- [48] Yajima T, Fukushima Y, Itai S, et al. Method of evaluation of the bitterness of clarithromycin dry syrup [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2002, 50(2): 147-152
- [49] Selvakumaran S, Muhamad I I, Abd R S. Evaluation of kappa carrageenan as potential carrier for floating drug delivery system: Effect of pore forming agents[J]. *CarbohydrPolym*, 2016, 135: 207-214
- [50] Chinthala C S K, Kota K S R, Hadassah M, et al. Formulation and evaluation of gastroretentive floating tablets of gabapentin using effervescent technology[J]. *Int J Pharm Biomed Res*, 2012, 3(4): 202-208
- [51] Jiménez-Castellanos M R, Zia H, Rhodes C T. Design and testing in vitro of a bioadhesive and floating drug delivery system for oral application[J]. *Int J Pharm*, 1994, 105(1): 65-70
- [52] Sharma M, Kohli S, Dinda A. In-vitro and in-vivo evaluation of repaglinide loaded floating microspheres prepared from different viscosity grades of HPMC polymer [J]. *Saudi Pharm J*, 2015, 23 (6): 675-682
- [53] Coppi G, Iannuccelli V. Alginate/chitosan microparticles for tamoxifen delivery to the lymphatic system[J]. *Int J Pharm*, 2009, 367(1-2): 127-132
- [54] Wee S, Gombotz W R. Protein release from alginate matrices[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 31(3): 267-285
- [55] Miyazaki S, Kubo W, Attwood D. Oral sustained delivery of theophylline using in-situ gelation of sodium alginate [J]. *J Control Release*, 2000, 67(2-3): 275-280
- [56] Tanigake A, Miyanaga Y, Nakamura T, et al. The bitterness intensity of clarithromycin evaluated by a taste sensor [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2003, 51(11): 1241-1245
- [57] Yang S F, Chen M K, Hsieh Y S, et al. Antimetastatic effects of Terminalia catappa L. on oral cancer via a down-regulation of metastasis-associated proteases[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(4): 1052-1058
- [58] Serp D, Cantana E, Heinzen C, et al. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization[J]. *BiotechnolBioeng*, 2000, 70(1): 41-53
- [59] Cabanas M V, Pena J, Roman J, et al. Room temperature synthesis of agarose/sol-gel glass pieces with tailored interconnected porosity[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 78(3): 508-514
- [60] Dima C, Patrascu L, Cantaragiu A, et al. The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules [J]. *Food Chem*, 2016, 195: 39-48
- [61] El-Zahaby S A, Kassem A A, El-Kamel A H. Design and evaluation of gastroretentive levofloxacin floating mini-tablets-in-capsule system for eradication of *Helicobacter pylori*[J]. *Saudi Pharm J*, 2014, 22(6): 570-579

- inhibitor[J]. J Korean Med Sci, 2013, 28(7): 1005-1014
- [10] Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, et al. TGM2 is a novel marker for prognosis and therapeutic target in colorectal cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(4): 967-972
- [11] Leicht D T, Kausar T, Wang Z, et al. TGM2: a cell surface marker in esophageal adenocarcinomas[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(6): 872-881
- [12] Erdem S, Yegen G, Telci D, et al. The increased transglutaminase 2 expression levels during initial tumorigenesis predict increased risk of metastasis and decreased disease-free and cancer-specific survivals in renal cell carcinoma[J]. World J Urol, 2015, 33(10): 1553-1560
- [13] Verma A, Wang H, Manavathi B, et al. Increased expression of tissue transglutaminase in pancreatic ductal adenocarcinoma and its implications in drug resistance and metastasis [J]. Cancer Res, 2006, 66(21): 10525-10533
- [14] Shibue T, Weinberg R A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14(10): 611-629
- [15] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890
- [16] Pierce A, Whetton A D, Meyer S, et al. Transglutaminase 2 expression in acute myeloid leukemia: association with adhesion molecule expression and leukemic blast motility [J]. Proteomics, 2013, 13(14): 2216-2224
- [17] Eckert R L, Kaartinen M T, Nurminskaya M, et al. Transglutaminase regulation of cell function[J]. Physiol Rev, 2014, 94(2): 383-417
- [18] Mehta K. Biological and therapeutic significance of tissue transglutaminase in pancreatic cancer[J]. Amino Acids, 2009, 36(4): 709-716
- [19] Agnihotri N, Mehta K. Transglutaminase-2: evolution from pedestrian protein to a promising therapeutic target [J]. Amino Acids, 2017, 49(3): 425-439
- [20] Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer [J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4741-4751
- [21] Kotiyal S, Bhattacharya S. Breast cancer stem cells, EMT and therapeutic targets [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(1): 112-116
- [22] Creighton C J, Chang J C, Rosen J M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 253-260
- [23] Jun J K, Choi K S, Lee H Y, et al. Effectiveness of the Korean National Cancer Screening Program in Reducing Gastric Cancer Mortality[J]. Gastroenterology, 2017, 152(6): 1319-1328
- [24] Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, et al. Gastric cancer [J]. The Lancet, 2016, 388(10060): 2654-2664
- [25] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-E386
- [26] Wang G, Liu J, Cai Y, et al. Loss of Barx1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through up-regulating MGAT5 and MMP9 expression and indicates poor prognosis [J]. ONCOTARGET, 2017, 8(42): 71867-71880
- [27] Huang S, Ingber D E. A non-genetic basis for cancer progression and metastasis: self-organizing attractors in cell regulatory networks[J]. Breast Dis, 2006, 26: 27-54
- [28] Lambert A W, Pattabiraman D R, Weinberg R A. Emerging Biological Principles of Metastasis[J]. Cell, 2017, 168(4): 670-691
- [29] Steeg P S. Targeting metastasis [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(4): 201-218
- [30] Chao D T, Korsmeyer S J. BCL-2 family: regulators of cell death[J]. Annu Rev Immunol, 1998, 16: 395-419
- [31] Delbridge A R, Grabow S, Strasser A, et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(2): 99-109

(上接第 1841 页)

- [62] Parikh D C, Amin A F. In vitro and in vivo techniques to assess the performance of gastro-retentive drug delivery systems: a review[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5(9): 951-965
- [63] Quispe-Condori S, Saldana M D A, Temelli F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying [J]. LWT-Food SciTechnol, 2011, 44(9): 1880-1887
- [64] Cam M, Icyer N C, Erdogan F. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development [J]. LWT-Food SciTechnol, 2014, 55(1): 117-123
- [65] Sharma M, Kohli S, Dinda A. In-vitro and in-vivo evaluation of repaglinide loaded floating microspheres prepared from different viscosity grades of HPMC polymer [J]. Saudi Pharm J, 2015, 23(6): 675-682
- [66] Venkateswarlu V, Manjunath K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles [J]. J Control Release, 2004, 95(3): 627-638