

文章编号:1673-0062(2013)01-0069-06

载药果胶基纳米粒子体外 HepG2 肝癌细胞的靶向性研究

王彦妹,李娜梅,刘格莎,贺冬秀,唐国涛,雷小勇,严奉祥,喻翠云*

(南华大学 药学系药物药理研究所,湖南 衡阳 421001)

摘要:具有良好的生物相容性且生物可降解天然多糖,一直作为药物传递体系,具有如下优点:可延长药物的生物半衰期,减轻药物的毒副作用.本实验旨在制备一种果胶基载 5-氟脲嘧啶(5-Fluorouracil,5-FU)纳米粒子(P-5-FU)载药系统,探讨果胶基纳米载药体系本身带有大量的半乳糖残基这种天然靶头对人肝癌细胞 HepG2 的靶向效果.MTT 法测定载药果胶基纳米粒子对 HepG2 和 A549 细胞的增殖抑制作用,MTT 结果显示 P-5-FU 对 HepG2 细胞的增殖具有明显抑制作用,呈剂量依赖性,且作用较 5-FU 强;而 P-5-FU 对 A549 细胞增殖亦有明显抑制作用,呈剂量依赖性,但与 5-FU 相比无明显差别;高效液相色谱法(HPLC)对两种细胞对载药纳米粒子的摄取情况和靶向性进行了测定.细胞摄取结果显示 HepG2 细胞对 P-5-FU 的摄取量较 5-FU 明显增多,而 A549 细胞对 P-5-FU 和 5-FU 的摄取量没有明显的差别.半乳糖饱和 ASGPR 结合位点后两种细胞对 P-5-FU 和 5-FU 的摄取量都没有明显的差别.结果表明果胶基纳米载药粒子可特异性靶向高表达的细胞.

关键词:果胶基纳米粒子;HepG2;ASGPR;靶向给药体系

中图分类号:R94

文献标识码:B

In vitro Evaluation of Pectin Nanoparticles Targeting Effect for Hepatocellular Carcinoma Cells

WANG Yan-mei, LI Na-mei, LIU Ge-sha, HE Dong-xiu, TANG Guo-tao,
LEI Xiao-yong, YAN Feng-xiang, YU Cui-yun*

(Institute of Pharmacy & Pharmacology, Department of Pharmacy, University of South China,
Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Natural polysaccharide with good biocompatibility and biodegradability is always used as drug delivery system which offered numerous advantages, including reducing side

收稿日期:2013-01-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20774070);湖南省教育厅基金资助项目(10C1179);博士启动基金资助项目(2010XQD37)

作者简介:王彦妹(1985-),女,河北邢台人,南华大学药学与生命科学院硕士研究生.主要研究方向:抗肿瘤药物传递系统.*通讯作者

effects, prolonging duration time, retaining drug bioactivity, and thus improving the therapeutic efficiency. This study aimed to propose a targeting human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) drug delivery system based on pectin nanoparticles whose chains have a large number of galactose residues and evaluate their targeting effect on HepG2 cells. Cytotoxicity study (MTT) in HepG2 and A549 cell lines demonstrates that the resulting 5-fluorouracil (5-FU)-loaded nanoparticles are more potent in killing cancer cells with over-expressed asialoglycoprotein receptor (ASGPR) on their surface, compared to free drug. While 5-FU-loaded nanoparticles can also inhibit the proliferation of A549 cells in a dose-dependent way, but there is no significant difference compared with free 5-FU. Cellular uptake of 5-FU and P-5-FU by HepG2, A549 cells was detected by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The HPLC results illustrate that the HepG-2 cells can uptake more P-5-FU than free 5-FU, while co-incubated with galactose the HepG-2 cells has a relatively low uptake rate compared with P-5-FU and was closely comparable to that of free 5-FU. But the amount of 5-FU and P-5-FU in A549 cells was almost the same, when co-incubated with galactose for 2h the amount of uptake of the two cell line also has no significant difference. The results indicate that the additional galactose competes with the “galactose residues” in the pectin-based nanoparticles for binding to HepG2 cells, thus affects significantly the targeting efficacy of nanoparticles. However, no obvious difference was observed for A549 cells under the same condition. The overall results confirm the targeting efficacy of pectin-based nanoparticles towards HepG2 cells.

key words: pectin nanoparticles; HepG2; ASGPR; TDD

癌症是人类第一大杀手, 肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC, 以下简称肝癌)是世界上第五大常见肿瘤^[1]. 据统计, 每年新增 HCC 病例达 50 多万例, 死亡病例达 6 万多例^[1]. 5-氟脲嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)作为目前最广泛应用的细胞毒抗肿瘤药物之一, 对结肠癌、乳腺癌、胃肠道癌、肝癌等癌症显示良好的治疗效果, 但同时也伴随着很强的毒副作用如骨髓抑制、胃肠道反应、白细胞减少症、血小板减少等这可能是由于较高的血药浓度和抗癌药物的非特异性的全身分布引起的^[2], 这一点严重限制了其临床应用. 此外, 口服给药后药物在胃肠道中的吸收是非均匀, 这是药物被二氢嘧啶脱氢酶或尿嘧啶还原酶代谢所致^[3]. 因此, 为了避免这些缺点, 药物传递系统如: 纳米粒子, 脂质体, 微乳剂等应运而生^[4-7].

靶向给药(Targeted drug delivery, TDD)是指药物通过局部或全身血液循环而浓集定位于靶组织、靶器官、靶细胞的给药方式, 分为主动靶向和被动靶向两种方式^[8]. 纳米粒子, 脂质体和胶束可以通过肿瘤 EPR (Enhanced Permeability and Retention)效应被动靶向于肿瘤组织, 同时也可通过对纳米载体上接枝配体, 利用肿瘤细胞中某些

酶和受体的高水平表达实现主动靶向^[8-10].

去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)是一种跨膜蛋白, 主要存在于哺乳动物肝实质细胞表面能专一识别分子末端带有半乳糖残基的糖蛋白, 并与之结合, 定向转运到肝细胞内的溶酶体进行代谢^[11]. 每个肝细胞包含大约 200 万 ASGPR 的结合位点^[12]. 因此, 研究人员开始研究以去唾液酸糖蛋白受体为靶点的药物传递系统, 希望带有半乳糖残基的药物传递体系可以通过血液循环将抗肿瘤药物运送到肿瘤组织, 从而增加抗癌药物的局部浓度^[13-14]. 近年来, 研究人员致力于天然的聚合物纳米粒子的研究, 因其具有良好的生物相容性, 无毒, 生物可降解性和可调节的控制释放特性^[15-16]. 果胶是应用最广泛的天然多糖之一, 其带有大量的半乳糖残基, 而半乳糖可以与 ASGPR 结合, 从而实现主动靶向肝实质细胞的作用. 我们课题组前期已经合成果胶基载药纳米粒子, 并对其粒径, 形貌, 载药量, 体外释药的特点进行了研究^[17].

本研究的目的是对载药纳米粒子在体外的细胞毒性, 细胞摄取进行评价. 研究发现, 一些肿瘤细胞如 Caco-2、HT-29^[18] 结肠癌细胞及 HepG2

肝癌细胞^[19]等表面也有去唾液酸糖蛋白受体表达,而 A549 肺癌细胞是典型的没有 ASGPR 表达的细胞,故本研究使用了 A549 肺癌细胞作为 HepG2 肝癌细胞的对照来进行体外的细胞毒性、细胞摄取及靶向性的评价。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP-1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司) 5-氟尿嘧啶(5-FU),果胶(Sigma 公司, P9135, $M_w = 1.18 \times 10^5$ g/mol,多角度激光散射测定),碳酸氢钠(上海国药),氢氧化钙(天津科密欧有限公司). MTT(美国 Amresco 公司),乙腈(天津科密欧有限公司),DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司), HepG2 人肝癌细胞株(上海生命科学研究院), A549 人肺癌细胞株(南华大学药学与生命科学学院陈临溪课题组友情提供),其余试剂均为分析纯。

1.2 果胶基载药纳米粒子的制备、表征、载药量、包封率及体外释放

载 5-FU 果胶基纳米粒子的制备,表征,载药量,包封率及体外释放采用我们课题组之前的方法^[17]。

1.3 MTT 法检测 5-FU、P-5-FU 及空白纳米粒子对肿瘤细胞的增殖抑制作用

取对数生长期的 HepG2 肝癌细胞及 A549 肺癌细胞,吸弃培养液,用 0.25% 胰酶消化,用含血清的培养液终止消化,制成细胞悬液,调整细胞密度至 5×10^4 /mL,轻轻吹匀后接种于 96 孔板,每孔 200 μ L,置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的孵箱培养,24 h 后吸弃培养液,分别加入含 5-FU 和 P-5-FU 的培养液,设 5、1.7、0.56、0.19、0.0063、0.0021、0.0007 mmol/L 等 7 个浓度及对照组,每组 3 个复孔。继续置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的孵箱培养,48 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μ L,孵箱避光培养 4 h 后,吸弃上清,每孔加入 150 μ L DMSO,震荡 10 min 分钟,使结晶物充分溶解混匀,用酶标仪检测每孔于波长 570 nm 的光吸收值,按公式计算每组浓度抑制率:抑制率% = (对照组 OD 值 - 给药组 OD 值)/对照组 OD 值 $\times 100\%$,并用 SPSS 18.0 计算 5-FU 及 P-5-FU 对 HepG2 肝癌细胞及 A549 肺癌细胞的 IC50 值。

1.4 HPLC 方法检测 HepG2 及 A549 细胞对 5-FU 及 P-5-FU 的摄取情况

1.4.1 溶液的配制

5-Fu 用水配成浓度为 10 g/L 的溶液备用,5-BrU 用水配成 0.5 g/L 的溶液备用。

1.4.2 给药及样品采集

取对数生长期的 HepG2 肝癌细胞及 A549 肺癌细胞,吸弃培养液,用 0.25% 胰酶消化,用含血清的培养液终止消化,制成细胞悬液并调整细胞密度,轻轻吹匀后按 1×10^6 /孔的密度接种于 6 孔板,每孔含培养液 2 mL,置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的孵箱培养,每 2 d 换液一次,直至细胞铺满整个孔的底部。实验开始前 24 h 更换新鲜的培养液。给药前 1 h,吸弃培养液,用常温 PBS 轻轻洗 2 次,然后加入 1 mL HBSS(另设一组加入 800 mmol/L 的半乳糖,观察半乳糖对 HepG2he A549 两种细胞对 P-5-FU 的摄取的影响),在 37 $^{\circ}C$ 孵育 120 min。吸弃上清液,加入分别含 0.5 mM/L 的 5-FU 和 P-5-FU 的 HBSS,分别在 120 min 时,(设空白对照组)吸弃含药物的上清液,用预冷的 HBSS 洗 3 次,然后加入 200 μ L 去离子水,放入 -80 度冰箱保存,设 3 个复孔。

1.4.3 样品分析

色谱条件:色谱柱:Kromasil C18 色谱柱(4.6 mm $\times$ 200 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(体积比为 5:99);流速:0.9 mL/min;检测波长:265 nm;柱温:室温。

样品处理:将样品从 -80 度冰箱取出,反复冻融 3 次裂解细胞,低温离心机 12 000 r/min 离心 15 min,取上清 200 μ L 加内标(0.05 g/L)20 μ L 和 1 mL 乙酸乙酯,涡旋混合 4 min,4 000 r/min 离心 10 min,取乙酸乙酯层,氮气流吹干,残渣用 50 μ L 流动相溶解,20 μ L 进样。

1.4.4 标准曲线的建立

取对数生长期的 HepG2 肝癌细胞及 A549 肺癌细胞,吸弃培养液,用 0.25% 胰酶消化,用含血清的培养液终止消化,制成细胞悬液并调整细胞密度,轻轻吹匀后按 1×10^6 /m² 的密度接种于 6 孔板,直至细胞铺满整个孔的底部,离心取上清,加入 5-FU 标准溶液,配制成终浓度为 0.5、2.5、10、100 μ g/mL 的样品,样品的提取按“1.4.3 样品的处理”以 HPLC 检测其中 5-FU 含量,制作标准曲线。每组设 3 个复孔。

2 结果与讨论

2.1 果胶基载药纳米粒子的制备,表征,载药量,包封率及体外释放

载药纳米粒子的制备方法、表征参、载药量、包封率及体外释放参照本课题组之前的方法^[17].包封率达到了 37.7%,载药量 28.14%,并且在平 pH = 7.4 的中性溶液中表现出明显的控释特性.图 1 是果胶基纳米粒子的透射电镜照片,从 TEM 电镜结果可以看出,果胶基纳米粒子的平均粒径在 40 – 80 nm 之间.

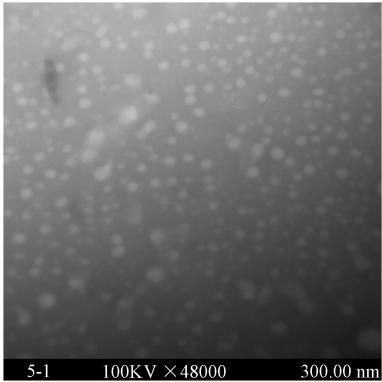


图 1 果胶基纳米粒子的电镜照片

Fig. 1 TEM images of pectin based nanospheres

2.2 5-FU 及 P-5-FU 对 HepG2 肝癌细胞和 A549 肺癌细胞的增殖抑制作用

本研究采用 MTT 法考察了 5-FU、P-5-FU 及空白纳米粒子对 HepG2 肝癌细胞和 A549 肺癌细胞的增殖抑制作用.空白纳米粒浓度与载药纳米粒浓度相同,不同浓度的空白纳米粒子均未对两种癌细胞产生抑制作用,最高浓度空白纳米粒对 HepG2 和 A549 细胞平均抑制率分别为 4.07% 和 10.07%,图 2 表示两种细胞在高浓度的空白纳米粒子中处理 48 h 后的生存率,说明所制备的果胶基纳米粒子具有很好的生物相容性.

图 3 表示的是 5-FU 及 P-5-FU 对 HepG2 及 A549 两种肿瘤细胞株的增殖抑制作用.图 3A 表明 P-5-FU 对 HepG2 细胞的增殖具有明显抑制作用($p < 0.05$),且呈剂量依赖性,作用较 5-FU 明显增强;而图 3B 表明 P-5-FU 和 5-FU 对 A549 细胞增殖抑制作用,未见明显差别($p > 0.05$).从表 1 和图 3 可以看出,对 HepG2 细胞而言,P-5-FU 的 IC₅₀ 值较游离 5-FU 的 IC₅₀ 明显减小;而对 A549 细胞而言,P-5-FU 的 IC₅₀ 值与游离 5-FU

的 IC₅₀ 值之间并无显著差异.

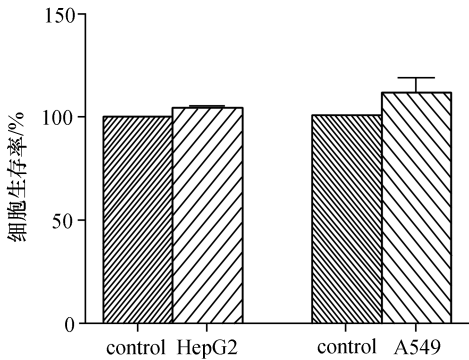


图 2 空白纳米粒子不同肿瘤细胞株的增殖抑制作用
Fig. 2 The inhibition rate of blank nanoparticles on HepG2 and A549 cells

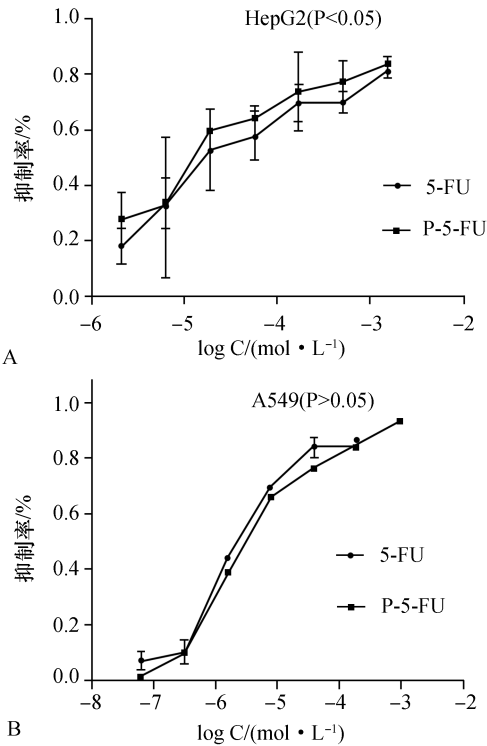


图 3 5-FU 及 P-5-FU 对不同肿瘤细胞株的增殖抑制作用 (A-B) ($n = 3$)

Fig. 3 The inhibition rate of 5-FU and P-5-FU on HepG2 and A549 cells

表 1 5-FU 及 P-5-FU 对不同肿瘤细胞株的 IC₅₀ 值

Table 1 The IC₅₀ of 5-FU and P-5-FU on HepG2 and A549 cells

		IC ₅₀ /(mol · L ⁻¹)	
		HepG2	A549
5-FU	0.45 × 10 ⁻⁴ ± 0.4339	0.44 × 10 ⁻⁵ ± 0.07308	
P-5-FU	0.17 × 10 ⁻⁴ ± 0.4269	0.52 × 10 ⁻⁵ ± 0.0393	

2.3 标准曲线的建立

取 HepG2 及 A549 空白细胞液,分别加入系列标准溶液,按“样品处理”项下依法操作.以细胞液中 5-Fu 待测浓度为纵坐标,待测物与内标物峰面积比值为横坐标,得回归方程,见图 4.

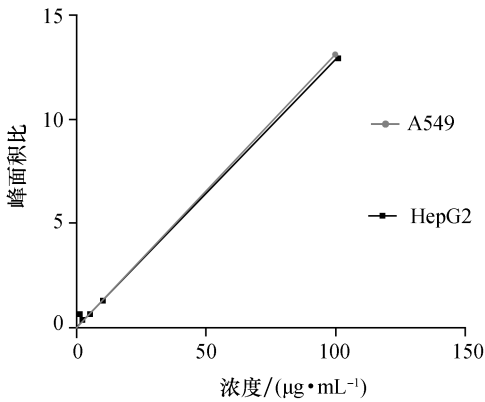


图 4 5-FU 在 HepG2 细胞液和 A549 细胞液中的标准曲线($n=3$)

Fig.4 Calibration curves of 5-FU in HepG2 and A549 cytosol

配置 5-Fu 在 HepG2 及 A549 空白细胞液中低、中、高 3 个浓度的样品,经处理后进样,测定日

间、日内精密度均小于 5% ,见表 2.

配置 5-Fu 在 HepG2 及 A549 空白细胞液中低、中、高 3 个浓度的样品,以提取后色谱峰面积除以未经提取直接进样获得的色谱峰面积,得回收率,均高于 85% ,见表 2.

2.4 HepG2 及 A549 细胞对 5-FU 及 P-5-FU 的摄取情况

研究采用 HPLC 法测定两种细胞对 5-FU 和 P-5-FU 的摄取情况,半乳糖可与 ASGPR 结合,竞争性的抑制 ASGPR 与含半乳糖微粒的结合^[20]. 为了验证 P-5-FU 和 5-FU 与 HepG2 细胞的结合量的差异确与 ASGPR 介导有关,将半乳糖预先加入含 HepG2 细胞或 A549 细胞 6 孔板中,预饱和细胞表面 ASGPR 的结合位点,然后再加入 P-5-FU (G-P-5-FU)和 5-FU. 如图 5 所示. HepG2 对 P-5-FU 的摄取量是 5-FU 的 2.1 倍,在加入半乳糖后,P-5-FU 与 HepG2 细胞的结合量显著降低,且与 5-FU 的摄取量无差别. 而 A549 细胞对 P-5-FU 和 5-FU 摄取没有明显的差别而半乳糖的加入对 P-5-FU 和 5-FU 与 A549 细胞的结合量均无影响. 以上结果均表明,P-5-FU 与 HepG2 细胞结合量的提高是通过 ASGPR 介导途径实现的.

表 2 5-FU 在不同细胞液中的标准曲线

Table 2 Calibration curves of 5-FU in HepG2 and A549 cytosol

	标准曲线	线性范围	r	日内 RSD	日间 RSD	提取回收率
HepG2	$y=0.1314x-0.0707$	0.5~200	0.999 5	1.538%	0.1711%	92.65%
A549	$y=0.1318x+0.0142$	0.5~100	0.999 9	0.544%	2.086%	87.77%

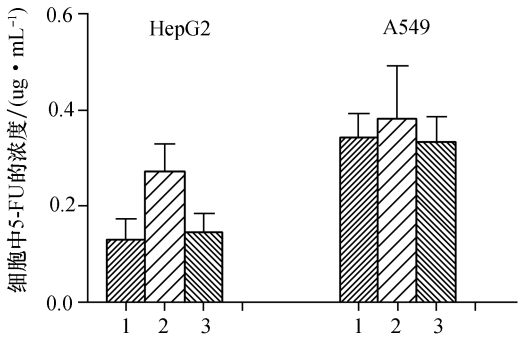


图 5 HepG2 及 A549 细胞对 5-FU 及 P-5-FU 的摄取情况及半乳糖对细胞对 P-5-FU 摄取的影响 ($n=3$) 1:5-FU 2:P-5-FU 3:G-P-5-FU

Fig.5 The amount of cellular uptake of 5-FU and P-5-FU by HepG2 and A549 cells and the effect of galactose on the cell uptake of 5-FU and P-5-FU

提示 P-5-FU 对高表达 ASGPR 的肿瘤细胞可能有靶向作用,可能的机制是 5-FU 半乳糖苷的半乳糖基可特异识别肿瘤细胞表面的 ASGPR 受体,通过介导细胞内吞而加速肿瘤细胞对其摄取.

3 结 论

近年来,ASGPR 介导靶向是肝靶向药物传递系统研究的热点.采用天然果胶基载 5-FU 纳米粒子^[17],利用果胶基纳米载药体系本身带有大量的半乳糖残基这种天然靶头实现主动靶向的作用,验证了其对 HepG2 细胞(含 ASGPR 受体)和 A549 细胞(不含 ASGPR 受体)的增殖抑制率及两种细胞株对果胶基纳米载药体系的摄取情况.实验表明 P-5-FU 与 HepG2 细胞的结合量显著高于 5-FU;而二者与 A549 细胞的结合量无区别;而

当 HepG2 细胞表面的 ASGPR 被半乳糖预饱和后, P-5-FU 与 HepG2 细胞的结合量显著降低, 与 5-FU 的结合量基本相当. 证实了 P-5-FU 中暴露在纳米粒子表面的半乳糖残基, 可被 HepG2 细胞表面的 ASGPR 特异性识别, 既果胶基载药纳米粒子具有主动靶向肝癌细胞的特性. 表明果胶基纳米粒子作为一个靶向肝脏疾病的药物传递系统具有很好的应用前景.

参考文献:

- [1] Lord R, Suddle A, Ross P J. Emerging strategies in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma; the role of targeted therapies[J]. International Journal of Clinical Practice, 2011, 65(2): 182-188.
- [2] Kodama Y, Fumoto S, Nishi J, et al. Absorption and distribution characteristics of 5-fluorouracil (5-FU) after an application to the liver surface in rats in order to reduce systemic side effects[J]. Biol. Pharm. Bull., 2008, 31(5): 1049-1052.
- [3] Cooke J W B, Bright R, Coleman M J, et al. Process research and development of a dihydropyrimidine dehydrogenase inactivator: Large-scale preparation of eniluracil Using a Sonogashira coupling[J]. Org. Pro. Res. Dev., 2001, 5(4): 383-386.
- [4] Yu C Y, Jia L H, Yin B C, et al. Fabrication of nanospheres and vesicles as drug carriers by self-Assembly of alginate[J]. J. Phys. Chem. C., 2008, 112: 16774-16778.
- [5] Kim T H, Park I K, Nah J W, et al. Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier[J]. Biomaterials, 2004, 25: 3783-3792.
- [6] Onaca O, Enea R, Hughes D W, et al. Stimuli-responsive polymersomes as nanocarriers for drug and gene delivery[J]. Macromol. Biosci., 2009, 9(2): 129-139.
- [7] Myung S J, Kim H S, Kim Y, et al. Fluorescent silk fibroin nanoparticles prepared using a reverse microemulsion[J]. Macromol. RES., 2008, 16(7): 604-608.
- [8] Lowery A, Onishko H, Hallahan D E, et al. Tumor-targeted delivery of liposome-encapsulated doxorubicin by use of a peptide that selectively binds to irradiated tumors[J]. J. Contr. Rel., 2004, 100: 275-292.
- [9] Acharya S, Sahoo S K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect[J]. Adv. Drug Deliv. Rev., 2011, 63: 170-183.
- [10] Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery[J]. J. Contr. Rel., 2010, 148: 135-146.
- [11] Yik J H N, Saxena A, Weigel P H, et al. The minor subunit splice variants, H2b and H2c, of the human asialoglycoprotein receptor are present with the major subunit H1 in different hetero-oligomeric receptor complexes[J]. J. Biol. Chem., 2002, 277: 23076-23083.
- [12] Fallon R J, Danaher M, Saxena A. The Asialoglycoprotein receptor is associated with a tyrosine kinase in HepG2 cells[J]. J. B. C., 1994, 269: 26626-26629.
- [13] Diaz C, Vargas E, Gatijens B O, et al. Cytotoxic effect induced by retinoic acid loaded into galactosyl-sphingosine containing liposomes on human hepatoma cell lines[J]. Int J Pharm., 2006, 325(1/2): 108-115.
- [14] Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, et al. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium[J]. Cancer Res., 1982, 42(9): 3858-3862.
- [15] Das R K, Kasoju N, Bora U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells[J]. Nanomedicine: N. B. M., 2010, 6(1): 153-160.
- [16] Ernsting M J, Tang W L, MacCallum N W, et al. Pre-clinical pharmacokinetic, biodistribution, and anti-cancer efficacy studies of a docetaxel-carboxymethylcellulose nanoparticle in mouse models[J]. Biomaterials., 2012, 33: 1445-1454.
- [17] Yu C Y, Cao H, Zhang X C, et al. Hybrid nanoparticles and vesicles based on pectin as drug carriers[J]. Langmuir, 2009, 25(19): 11720-11726.
- [18] Mu J Z, Gordon M, Shao J S, et al. Apical expression of functional asialoglycoprotein receptor in the human intestinal cell line HT-29[J]. Gastroenterology, 1997, 113(5): 1501-1509.
- [19] Cheng M R, He B, Wan T, et al. 5-fluorouracil nanoparticles inhibit hepatocellular carcinoma via activation of the p53 pathway in the orthotopic transplant mouse model[J]. PLOS ONE, 2012, 7(10): e47115.
- [20] 黄容琴, 裴元英. 主动肿瘤靶向给药系统的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(8): 505-509.