

# 再沉淀法制备复合纳米药物及体外抗肿瘤研究

徐 越, 吴传芳

(四川大学生命科学学院功能基因组实验室, 成都 610065)

**摘 要:** 本文利用两种不同的抗肿瘤药物阿霉素(DOX)和苯丁酸氮芥(Cb)混合,通过再沉淀法制备了一种新型的复合药物纳米粒子。<sup>1</sup>H NMR 证明了 DOX 和 Cb 混合后通过氨基和羧基静电力相互作用形成超分子复合物,通过 DLS、SEM、AFM、TEM 等表征证明了复合药物纳米粒子具有规整的形貌,较窄的尺寸分布. 三种肿瘤细胞模型(MCF-7、A549、HepG<sub>2</sub>)的细胞毒性实验证明了复合药物纳米粒子相比于单独的 DOX、Cb、DOX/Cb 混合物有着更好杀死肿瘤细胞的效果. 选取 HepG<sub>2</sub> 采用 Hoechst 染色检测凋亡细胞成像以及 Western 说明了复合药物纳米粒子能更好的诱导了肿瘤细胞的凋亡. 共聚焦实验则很好的验证了相比于自由药阿霉素(DOX),复合药物纳米粒子可以更容易被肿瘤细胞内吞.

**关键词:** 阿霉素 DOX; 苯丁酸氮芥 Cb; 再沉淀法; 复合药物纳米粒子; 肿瘤治疗

**中图分类号:** R730.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)02-0394-07

## Preparation of composite nano drugs by reprecipitation and Study on its antitumor activity in vitro

XU Yue, WU Chuan-Fang

(Departement of Functional Genome, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** A novel composite drug nanoparticles (DOX-Cb nanoparticles) have been prepared by reprecipitation after hydrophobic anticancer drug Doxorubicin (DOX) and hydrophobic anticancer drug chlorambucil (Cb) being mixed. <sup>1</sup>H NMR confirms that DOX and Cb compound is formed via electrostatic force between amino group and carboxyl group. DLS, SEM, AFM and TEM confirm that Composite drug nanoparticles have regular morphology and a narrow size distribution. Cytotoxicity test by using three tumor models (MCF-7, A549, HepG<sub>2</sub>) shows Composite drug nanoparticles have better effect of killing tumor cells than free DOX, Cb and DOX/Cb mixture. Hoechst staining and western result by using HepG<sub>2</sub> suggest that Composite drug nanoparticles kill tumor by inducing tumor cells apoptosis. confocal experiment verifys DOX-Cb nanoparticles are easier endocytosed by tumor cells than DOX.

**Keywords:** Doxorubicin; Chlorambucil; Reprecipitation; Composite drug nanoparticles; Cancer therapy

## 1 引 言

当前数据统计结果显示,恶性肿瘤是危害人类健康的三大杀手之一,并且有着逐年上升的趋势. 恶

性肿瘤传统的治疗方式包括化疗、放疗和手术治疗,其中化疗是最重要的治疗恶性肿瘤的手段. 但是传统的化疗药物如紫杉醇、阿霉素、顺铂等药物本身具有疏水性,这会导致其治疗效果的降低以及对人体

收稿日期: 2017-03-23

基金项目: 国家自然科学基金(31300674)

作者简介: 徐越(1988—),女,四川乐山人,硕士研究生,主要从事细胞生物学研究. E-mail:1021159542@qq.com

通讯作者: 吴传芳. E-mail:wuchuanfang@scu.edu.cn

全身的毒副作用<sup>[1]</sup>.因此提高抗肿瘤疏水药物的水溶性一直是研究的热点.一个解决抗肿瘤药物水溶性通常的做法是设计亲水的载体材料来负载疏水药物,这种方法大大提高了药物的水溶性,并且可以通过EPR效应即高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect)使抗肿瘤药物在肿瘤处富集,从而降低药物的毒副作用<sup>[2-10]</sup>.但是这种方法有两个难以解决的问题,其一为了增加药物的水溶性,需要更多载体材料来负载药物导致药物的负载量低.其二是由于载体材料在体内代谢的不确定性,载体材料对人体潜在的毒性无法避免<sup>[11]</sup>.

为了解决目前抗肿瘤药物载药体系存在的问题,经过科研工作者们不断的尝试与探索,严等人提出了一种通过将两种抗肿瘤药物伊立替康和苯丁酸氮芥通过缩合反应共价结合在一起形成两亲性药物分子,这种两亲性药物分子可以在水中进行自组装形成纳米级的胶束聚集体,体外实验和体内实验证实这种策略相比自由药有着更好的抗肿瘤效果<sup>[12-14]</sup>.但是这种策略面临的一个问题是通过共价键结合两种药物产生的是一个新的药物,其药物代谢途径不能确定,这限制了其进一步的应用<sup>[15]</sup>.

近年来,超分子化学持续不断的快速发展,尤其通过自组装策略展现出越来越多的应用前景<sup>[16, 17]</sup>.现在有着更丰富的方式来制备超分子材料分子,比如通过主客体作用、氢键作用、配位键、静电作用等,静电作用力作为一种具备pH敏感的连接方式更多的应用在肿瘤的药物传递系统<sup>[18]</sup>.因此,我们考虑这种策略是否可以更简单的方式应用在药物传输系统之中,我们选用两种分别带有氨基的阿霉素和带有羧基的苯丁酸氮芥抗肿瘤药物通过静电力结合形成超分子药物结合体,运用再沉淀法技术制备出了超分子复合药物纳米粒子,通过<sup>1</sup>H NMR证明了两化疗药物通过氨基和羧基之间的静电相互作用形成超分子复合物,利用动态光闪射(DLS)、扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)、原子力显微镜(AFM)表征了纳米粒子的结构形貌.并进一步研究了体外细胞摄取以及对三种癌细胞HepG<sub>2</sub>、A549、MCF-7的杀灭效果.实验结果证实这种策略制备的复合药物纳米粒子有着更好的抗肿瘤效果.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

阿霉素(DOX)和苯丁酸氮芥(Cb)购于阿拉丁

(上海)试剂公司,二甲基亚砜(DMSO)、透析袋(1KD)购于恒信(成都)试剂公司;人乳腺癌细胞MCF7,购于中国科学院上海细胞保藏库,由本实验室保存于液氮中;人肺癌细胞A549和人肝癌细胞HepG<sub>2</sub>由本实验室保存于液氮;一抗Caspase3((8G10) Rabbit mAb #9665)购于CST公司,其二抗Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)购于Proteintech公司.

### 2.2 方法

2.2.1 复合药物纳米粒子制备 3mg 苯丁酸氮芥和 5.4mg 阿霉素(DOX)溶于 200 $\mu$ L 二甲基亚砜(DMSO)中,在超声的条件下逐滴加入到 10mL 水中,之后将混合液转移到透析袋(1kD)中透析,每隔 8h 换一次水,透析 24h,最后把透析袋中的液体定容到 20mL,转入棕色试剂瓶中存放备用.

2.2.2 细胞培养 不同细胞按照其合适的生长条件进行培养:

1) MCF-7: MEM 培养基中添加 10% 优质胎牛血清, 1.5g/L NaHCO<sub>3</sub>、0.11 g/L 丙酮酸钠、0.01 mg/mL 胰岛素, 1%(v/v)双抗;

2) A549: DMEM 培养基中添加 10% 优质胎牛血清, 1%(v/v)双抗;

3) HepG<sub>2</sub>: MEM 培养基中添加 10% 优质胎牛血清, 1%(v/v)双抗;

并放置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每隔 3-4d 左右进行传代,取对数生长期细胞用于实验研究.

2.2.3 细胞活力的 MTT 法检测 取对数生长期 HepG<sub>2</sub>、A549、MCF-7 细胞接种于 96 孔板,每孔 100 $\mu$ L,细胞密度为  $8 \times 10^3$ /孔,24h 后,实验组每孔分别加入终浓度为 0(对照组)、0.01、0.05、0.1、0.5、2.0、4.0、8.0 和 10.0 $\mu$ M Cb、DOX、DOX/Cb 混合物、DOX-Cb 纳米材料,每个浓度 5 个复孔,培养 48h 后,每孔加入 MTT 10 $\mu$ L,继续培养 4h 后,去除上清液,并每孔加入 DMSO 150 $\mu$ L,室温振荡摇匀,于酶标仪 490nm 处测定 OD 值.细胞存活率(%)=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) $\times 100\%$ .

2.2.4 细胞凋亡的 Hoechst 33258 染色检测 取对数生长期 HepG<sub>2</sub> 细胞接种于 6 孔板,每孔 2mL,细胞密度为  $2.5 \times 10^5$ /mL,24h 后,实验组每孔分别加入终浓度为 0(对照组)及 8 $\mu$ M Cb、DOX、DOX/Cb 混合物、DOX-Cb 纳米粒子,培养 24h 后,PBS 轻柔的洗涤细胞,4% 多聚甲醛固定细胞 15

min, PBS 洗涤, Hoechst 33258 染色液染色 30min, PBS 洗涤, 并于荧光显微镜下拍照.

2.2.5 细胞凋亡用 Western blot 检测 取对数生长期 HepG<sub>2</sub> 细胞接种于 6 孔板, 每孔 2mL, 细胞密度为  $2.5 \times 10^5$  /mL, 长到一半左右, 实验组每孔分别加入 Cb、DOX、DOX/Cb 混合物、DOX-Cb 纳米粒子终浓度为 0(对照组)和  $8 \mu\text{M}$  培养 24h 后, 离心收集细胞, 加入  $1 \times \text{SDS}$  裂解液, 插于冰上, 于涡旋仪裂解大约 30 min, 每隔 2~3min 振荡 30s, 离心获得上清液即为总蛋白. 采用 BCA 检测试剂盒检测蛋白浓度, 蛋白变性 10 min 并上样, 进行 15% SDS 凝胶电泳 3~4h, 湿法转膜 60 min.

5% 脱脂奶粉常温封闭 1h, 于一抗溶液 caspase 3 稀释度为 (1 : 1000) 中孵育,  $4^\circ\text{C}$  过夜, 隔天 PBST 洗涤后, 二抗溶液(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 Ig( H+L), 稀释度为 (1 : 5000) 室温孵育 1h, PBST 洗涤后, 滴加 ECL 曝光液, 并在暗室里胶片曝光.

2.2.6 药物入胞实验 把 HepG<sub>2</sub> 密度  $2.5 \times 10^5$  /孔接入 6 孔板中, 培养 24h, 加入  $24 \mu\text{M}$  的 DOX 和 DOX-Cb 纳米粒子分别作用 1h、3h、6h 后, 用 PBS 洗三次, 并用 Hoechst 33258 染色液  $37^\circ\text{C}$  染色 30min, 并在荧光显微镜下拍照.

3 结果与分析

3.1 DOX 与 Cb 基于氨基与羧基的静电力相互作用

两个分子之间的非共价键相互作用主要包括主客体作用、氢键作用、配位键、静电作用等<sup>[19-23]</sup>, 而核磁是检测非共价键相互作用力的常用方法之一. 为了验证 DOX 与 Cb 是否通过氨基与羧基的静电力相互作用, 本文采用核磁技术进行检测. 从图 1 我们可以看出在箭头的位置 DOX 与 Cb 混合后 Cb 处羧基的 H 消失, 这是由于 Cb 的羧基和 DOX 的氨基之间产生了相互作用导致了 Cb 羧基上的 H 在核磁上的信号消失. 从而证明 DOX 和 Cb 混合后通过氨基和羧基的静电相互作用形成超分子复合物.

3.2 复合药物纳米粒子的形貌表征

药物纳米粒子的尺寸及形貌对细胞摄取的过程有着重要的影响. 我们分别采用 DLS、SEM、AFM 和 TEM 来表征复合药物纳米粒子的尺寸及形貌. 图 2a DLS 结果可以看到, 复合药物纳米有着较窄的尺寸分布, 大小集中在 180nm 左右, 说明形成了较好的复合药物纳米粒子. 图 2b SEM 的结

果可以看到形成的复合药物纳米粒子形貌较为规整, 且为圆球形, 尺寸约为 150nm, 这个尺寸可以很好的被细胞摄取. 图 2c AFM 的结果可以看到结构完整的复合药物纳米粒子, 尺寸也与 SEM 观察到的结果一致. 图 2d TEM 的结果可以看出大量形貌均一, 尺寸约为 150nm 的复合药物纳米粒子<sup>[24]</sup>. 以上结果共同说明我们通过再沉淀法制备出了尺寸均一, 分散性良好的复合药物纳米粒子, 这为进一步的细胞实验奠定了基础.

3.3 复合药物纳米粒子的抗肿瘤效果

为了验证复合药物纳米粒子对肿瘤细胞的杀伤效果, 分别对三组不同的肿瘤细胞株 HepG<sub>2</sub>、A549、MCF-7 进行 MTT 实验<sup>[25]</sup>, 以 Cb、DOX、DOX/Cb 混合物作为对照, 选用 0(对照组)、0.01、0.05、0.1、0.5、2、4、8 和  $10 \mu\text{M}$  这几个浓度. 实验结果如图 3 所示, 从图中可以看到自由药 DOX、DOX/Cb 混合物处理 HepG<sub>2</sub>、A549、MCF-7 细胞 48h 后细胞毒性几乎一样, 但远远比自由药 Cb 高, 可能是肿瘤细胞中吸收 Cb 相对较难<sup>[12]</sup>. 而 DOX-Cb 复合药物纳米粒子的治疗效果依赖于药物的浓度. 当细胞培养基中药物浓度较低时, DOX-Cb 复合药物纳米粒子与自由药 DOX、DOX/Cb 混合物抗肿瘤效果相当, 而药物浓度较高时则抗肿瘤的效果比自由药更好. 这是由于 DOX-Cb 复合药物纳米粒子在较低浓度时以单体的形式存在, 在较高浓度才能以复合药物纳米粒子的形式存在, 更好的分散在培养基中被细胞摄取从而发挥药效<sup>[13]</sup>. 图 3 中还可以看到三种不同的肿瘤细胞株均表现出了相同的趋势, 说明 DOX-Cb 复合药物纳米粒子具有广谱的抗肿瘤效果.

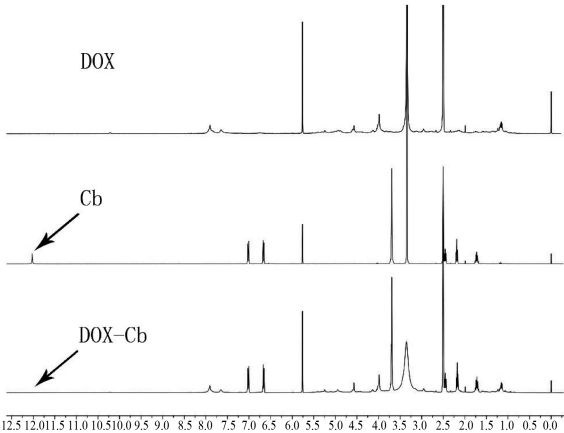


图 1 DOX、Cb 和 DOX-Cb 混合物的 H 核磁图  
Fig. 1 The <sup>1</sup>H NMR of DOX, Cb and DOX-Cb mixture

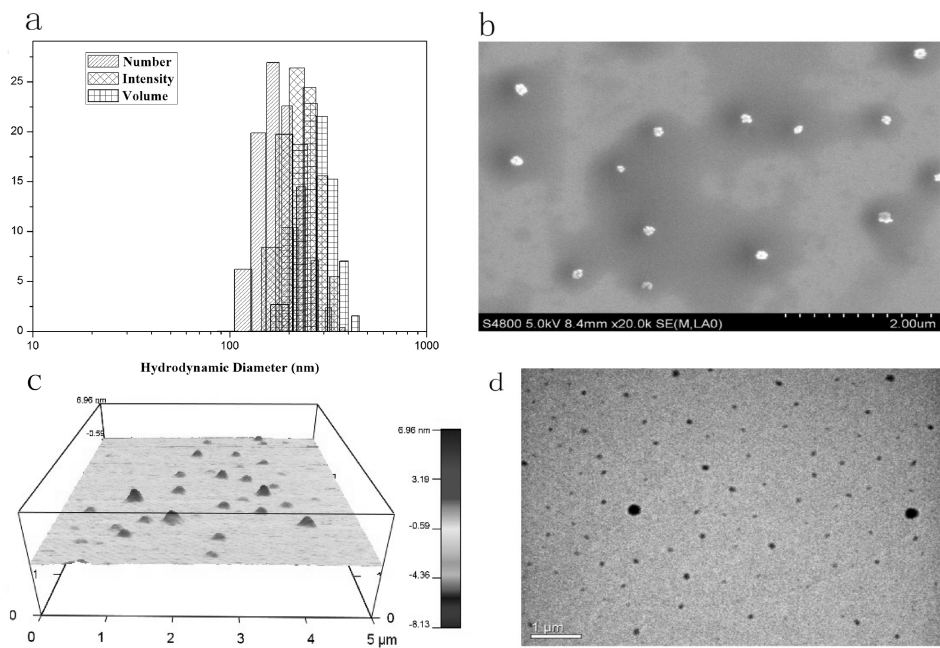


图 2 DOX-Cb 复合药物纳米粒子  
a. 动态光闪射(DLS), b. 扫描电子显微镜(SEM), c. 原子力显微镜(AFM), d. 透射电子显微镜(TEM)  
Fig. 2 DOX-Cb nanoparticles  
a. Dynamic Light Scattering(DLS), b. scanning electron microscope(SEM), c. Atomic Force Microscope(AFM), d. transmission electron microscopy(TEM)

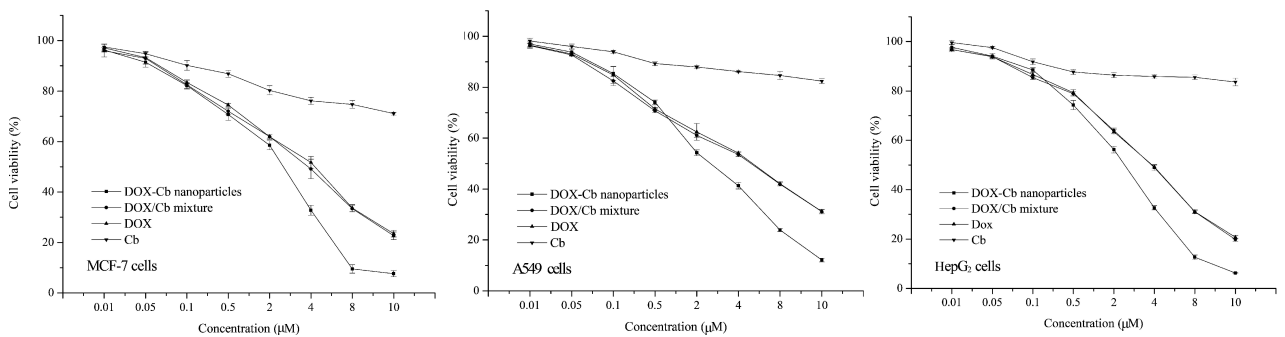


图 3 对 MCF-7、A549、HepG<sub>2</sub> 进行 Cb、DOX、DOX/Cb 混合物、DOX-Cb 纳米材料的体外毒性实验  
这些数据以平均值±标准偏差表示(n=5)

Fig. 3 Toxicity test of Cb, DOX, DOX/Cb mixture and DOX-Cb nanoparticles in vitro by MCF-7, A549, HepG<sub>2</sub> cells  
The data are presented as average±standard error (n=5)

为了验证 DOX-Cb 复合药物纳米粒子是否通过诱导凋亡这一途径杀伤肿瘤细胞, 我们用 HepG<sub>2</sub> 细胞加药进行处理观察细胞形态变化及 Hoechst 对细胞核的染色来说明细胞的生长时的凋亡情况见图 4. 在进行了 24h 的相同浓度 8 μM 的药物处理后, 在显微镜下观察到了 DOX-Cb 纳米材料处理的细胞较自由药及其混合物发生了明显细胞形态的变化, 说明其细胞生长状态异常, 出现细胞凋亡的症状<sup>[26]</sup>, Hoechst 染色可以明显的看出 DOX-Cb 复合药物纳米粒子组的细胞培养皿中的亮点更多, 也说明 DOX-Cb 复合药物纳米粒子诱导肿瘤细胞凋亡效率高于其它药物组, 这与

MTT 的实验结果一致, 进一步证实了 DOX-Cb 复合药物纳米粒子有着优于自由药 DOX、DOX/Cb 混合物的抗肿瘤效果.

肿瘤细胞凋亡过程中, 与凋亡相关的 caspase3 蛋白会有一个大量的表达. 我们通过 western 来检测不同给药组的 caspase3 蛋白表达情况, 从而得出不同给药组肿瘤细胞的凋亡情况见图 5. western 结果显示了在作用相同浓度 8 μM 和相同时间 24h 后, 用 DOX-Cb 纳米药物处理的 HepG<sub>2</sub> 细胞的 cleavedcaspase3 相比较于自由药 DOX 和 Cb 及其直接的混合物显著性增加, 而 procaspase3 则显著降低. 表明了药物是通过 caspase 凋亡途径发挥

作用,并且 DOX-Cb 纳米药物更好的诱导肿瘤细胞的凋亡,这之前 Hoechst 染色和 MTT 实验结果一致.

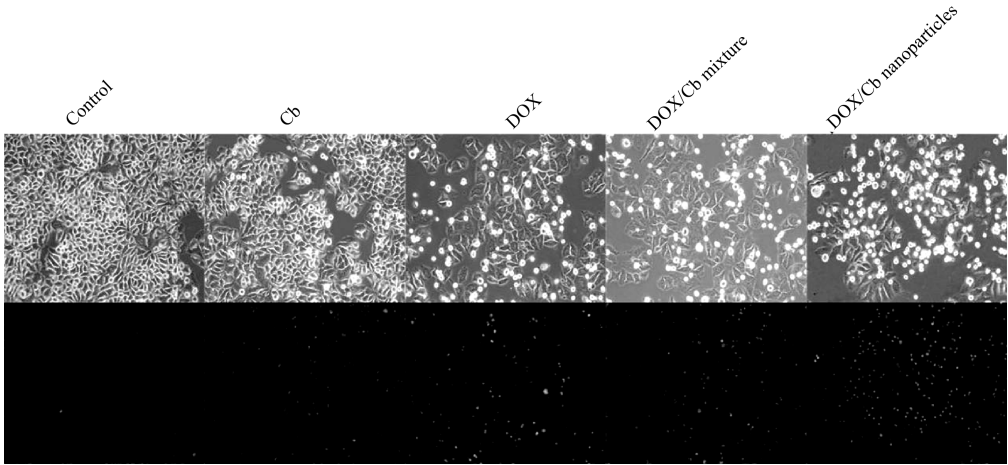


图 4 Hoechst 染色检测 Cb、DOX、DOX/Cb 混合物、DOX-Cb 纳米粒子的作用效果(200×)  
Fig. 4 Effect of Cb,DOX,DOX/Cb mixture,DOX-Cb nanoparticles apoptosis detected by Hoechst staining (200×)

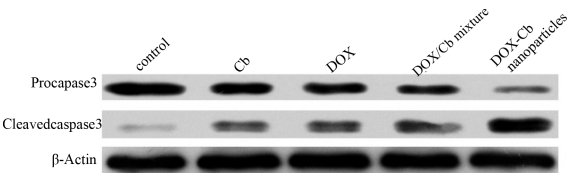


图 5 对 Cb、DOX、DOX/Cb 混合物、DOX-Cb 纳米粒子凋亡相关蛋白 caspase3 表达量的检测  
Fig. 5 Expression of Cb,DOX,DOX/Cb mixture,DOX-Cb nanoparticles detected by apoptosis related protein caspase3

3.3 复合药物纳米粒子的入胞效果

为了进一步探究 DOX-Cb 复合药物纳米粒子相比于自由药能更有效杀死肿瘤细胞的原因,我们认为 DOX-Cb 复合药物纳米粒子相比于自由药更容易被细胞摄取从而达到更好的杀伤肿瘤细胞效果,因此我们对药物的入胞进行了荧光监测.从图 6 中,比较 1、3、6h 的细胞入胞效果可以看出随着药物作用的时间加长而药物入胞的越多,说明药物分子逐渐被细胞摄取的过程.但是对比 DOX 自由药组和 DOX-Cb 复合药物纳米粒子组的入胞量我们可以明显的看出在相同的时间内 DOX-Cb 复合药物纳米粒子组的药物入胞量明显大于 DOX 自由药组,这是由于疏水的 DOX 在培养集中容易沉淀聚集从而难以被细胞摄取,但是分散性良好的 DOX-Cb 复合药物纳米粒子可以很好的被细胞摄取,从而可以起到更好的抗肿瘤效果<sup>[5]</sup>.

4 结 论

我们提出一种新的抗肿瘤药物递送策略,基于非共价作用力作用将两种抗肿瘤药物阿霉素和苯丁酸氮芥通过再沉淀法制备成复合药物纳米粒子,通过<sup>1</sup>H NMR 很好的说明了两药物通过氨基和羧基静电作用力相互作用形成了复合物,并对复合药物纳米粒子的 DLS、SEM、TEM、AFM 结构表征证实复合药物纳米粒子有着均一的尺寸,良好的水溶性.细胞毒性实验的结果证实这种复合药物纳米粒子相比于自由药物和药物混合物有着更好的肿瘤细胞杀伤效果,这是由于复合药物纳米粒子更容易被细胞摄取,而且有着协同治疗的效果,进一步的荧光检测实验证实复合药物纳米粒子更容易被细胞摄取,可以在更短的时间内实现入胞,从而可以发挥更好的治疗效果.

当前的抗肿瘤药物多数为疏水药物,普遍存在毒副作用大,治疗效果差的问题,我们提出的这种将疏水药物通过再沉淀法制备成复合药物纳米粒子,从而改善药物水溶性,可以在肿瘤细胞敏感释放药物,并且有着协同治疗杀死肿瘤细胞的效果<sup>[13]</sup>.这种新的策略为抗肿瘤化疗药物的递送提供了一种新的思路,并且这种制备方法可以应用到更多的药物当中,其策略的简单易用性使其有潜力成为一种新的临床用药方法.

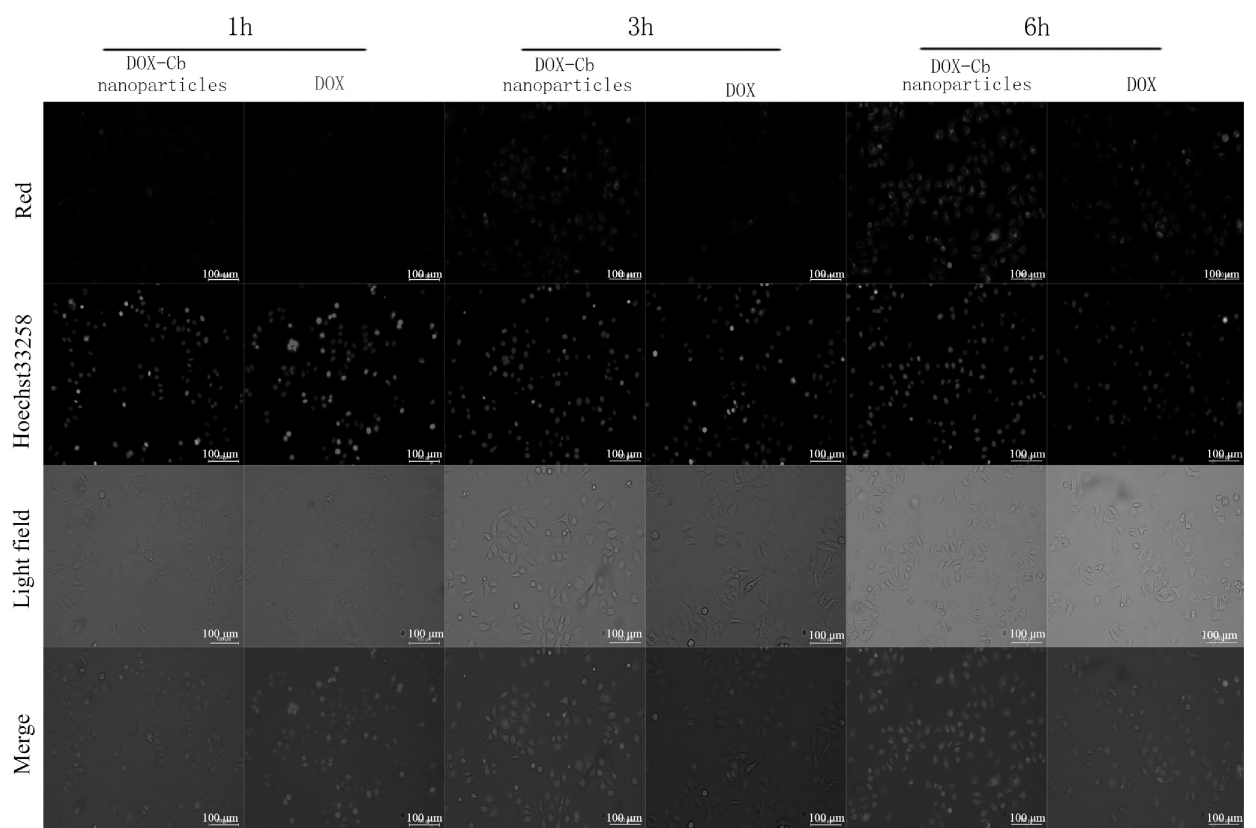


图 6 对 DOX-Cb 纳米粒子和 DOX 进行了 6h、3h、1h 的入胞 (HepG<sub>2</sub> 细胞) 实验  
Fig. 6 The experiment of HepG<sub>2</sub> uptake DOX-Cb nanoparticles and DOX by 1,3,6hours

参考文献:

[1]

Griffin A M, Butow P N, Coates A S, *et al.* On the receiving end V: Patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy in 1993 [J]. *Ann Oncol*, 1996, 7:189.

[2]

Cao J, Xie X, Lu A, *et al.* Cellular internalization of doxorubicin loaded star-shaped micelles with hydrophilic zwitterionic sulfobetaine segments [J]. *Biomaterials*, 2014, 35:4517.

[3]

Fleige E, Quadir M A, Haag R. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64:866.

[4]

Hu X, Hu J, Tian J, *et al.* Polyprodrug amphiphiles: hierarchical assemblies for shape-regulated cellular internalization, trafficking, and drug delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135:17617.

[5]

Li Y, Li Y, Zhang X, *et al.* Supramolecular PEGylated Dendritic Systems as pH/Redox Dual-Responsive Theranostic Nanoplatforms for Platinum Drug Delivery and NIR Imaging [J]. *Theranostics*, 2016, 6:1293.

[6]

Liang Y, Deng X, Zhang L, *et al.* Terminal modification of polymeric micelles with pi-conjugated moieties for efficient anticancer drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2015, 71:1.

[7]

Liu R, Li D, He B, *et al.* Anti-tumor drug delivery of pH-sensitive poly(ethylene glycol)-poly(L-histidine)-poly(L-lactide) nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2011, 152:49.

[8]

Luo K, Li C, Wang G, *et al.* Peptide dendrimers as efficient and biocompatible gene delivery vectors: Synthesis and in vitro characterization [J]. *J Control Release*, 2011, 155:77.

[9]

Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery [J]. *Nat Mater*, 2013, 12:991.

[10]

Shi J, Votruba A R, Farokhzad O C, *et al.* Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications [J]. *Nano Lett*, 2010, 10:3223.

[11]

Huang P, Wang D, Su Y, *et al.* Combination of small molecule prodrug and nanodrug delivery: amphiphilic drug-drug conjugate for cancer therapy [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136:11748.

[12]

Cai K, He X, Song Z, *et al.* Dimeric drug polymeric nanoparticles with exceptionally high drug loading

- and quantitative loading efficiency [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 3458.
- [13] Fan M, Liang X, Li Z, *et al*. Chlorambucil gemcitabine conjugate nanomedicine for cancer therapy [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 79: 20.
- [14] Zhang T, Huang P, Shi L, *et al*. Self-assembled nanoparticles of amphiphilic twin drug from floxuridine and bendamustine for cancer therapy [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12: 2328.
- [15] Palivan C G, Fischer-onaca O, Delcea M, *et al*. Protein-polymer nanoreactors for medical applications [J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 41: 2800.
- [16] Liu G, Wang X, Hu J, *et al*. Self-immolative polymersomes for high-efficiency triggered release and programmed enzymatic reactions [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 7492.
- [17] Pathak R K, Dhar S. A nanoparticle cocktail: temporal release of predefined drug combinations [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 8324.
- [18] Postupalenko V, Desplancq D, Orlov I, *et al*. Protein delivery system containing a nickel-Immobilized polymer for multimerization of affinity-purified his-tagged proteins enhances cytosolic transfer [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54: 10583.
- [19] Deng H, Liu J, Zhao X, *et al*. PEG-b-PCL copolymer micelles with the ability of pH-controlled negative-to-positive charge reversal for intracellular delivery of doxorubicin [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15: 4281.
- [20] Arnold W D, Eric O. The chemical nature of hydrogen bonding in proteins via NMR: J-Couplings, Chemical Shifts, and AIM theory [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 12835.
- [21] Vera F, Almuzara C, Orera I, *et al*. Side-chain supramolecular polymers with induced supramolecular chirality through H-bonding interactions [J]. *J Polym Sci Pol Chem*, 2008, 46: 5528.
- [22] Mahmudov K T, Kopylovich M N, Silva M F C G D, *et al*. Non-covalent Interactions in the Synthesis of Coordination Compounds: Recent Advances [J]. *Coordination Chem Rev*, 2016, 345: 54.
- [23] Khanpour M, Naghipour A, Azhdari Tehrani A, *et al*. The role of non-covalent interactions in the crystal structure of two new nano coordination polymers of Cd(II) and Hg(II) based on N,N'-Bis-pyridin-4-ylmethylene-naphthalene-1,5-diamine ligand [J]. *J Mol Struct*, 2017, 1135: 26.
- [24] 周玲玲. 纳米 BiOBr/I 复合材料的合成及其对有机物的光催化降解性能 [J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2015, 52: 370.
- [25] 任远航, 邓园杰, 金洪, 等. 15 种吡啶啉类似物对 AW1 神经细胞毒力测定与活体生物活性比较研究 [J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2016, 53: 909.
- [26] Li Y, Lai Y, Xu X, *et al*. Capsid-like supramolecular dendritic systems as pH-responsive nanocarriers for drug penetration and site-specific delivery [J]. *Nanomedicine*, 2016, 12: 355.