

川芎嗪纳米脂质体对 HUVEC 细胞 VEGF 基因表达的抑制作用

夏红梅¹, 程志清¹, 徐银祥²

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230031; 2. 兆科药业(合肥)有限公司, 合肥 230088)

摘要: 制备川芎嗪纳米脂质体, 并对其进行质量控制。3批川芎嗪脂质体的颗粒小于 220 nm; Zeta 电位大于 30 mV; 包封率分别为 43.89%±3.88%, 61.23%±4.71% 和 84.35%±6.67%。采用 MTT 和 Real-time PCR 方法研究川芎嗪及其脂质体对人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 增殖及对其 VEGF 基因表达的影响。结果表明, 川芎嗪及其脂质体对 HUVEC 细胞的增殖无统计学差异, 但下调 VEGF₁₆₅ 诱导的 HUVEC 细胞中 VEGF 基因的表达。它们可能通过抑制 VEGF 基因的表达而抑制血管新生, 其中川芎嗪脂质体的抑制作用较川芎嗪弱, 且随着包封率的提高, 作用依次减弱, 表明脂质体是一种缓慢释放的优良剂型, 有进一步临床应用价值。

关键词: 川芎嗪; 川芎嗪脂质体; 质量控制; VEGF 基因; 缓慢释放

中图分类号: R282.71; Q949.95

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)06-1034-05

Inhibition of tetramethylpyrazine-loaded liposomes on VEGF gene expression in HUVEC cells

XIA Hong-mei¹, CHENG Zhi-qing¹, XU Yin-xiang²

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031;

2. Zhaoke Pharmaceutical (Hefei) Co., Ltd, Hefei 230088)

Abstract: The three batches of tetramethylpyrazine-loaded liposomes were prepared, and the properties were as follows: the size of liposome was below 220 nm; Zeta electric potential was greater than 30 mV; the entrapment rates of them were 43.89%±3.88%, 61.23%±4.71% and 84.35%±6.67%, respectively. The inhibition of tetramethylpyrazine and tetramethylpyrazine-loaded liposomes on VEGF gene in HUVEC cells were explored. The results proved that tetramethylpyrazine and tetramethylpyrazine-loaded liposomes had no effect on the proliferation of HUVEC, but regulated lower VEGF gene expression and inhibited angiogenesis. Tetramethylpyrazine-loaded liposomes had lower effect than tetramethylpyrazine. Furthermore, the effects would be weakened with the increase of entrapment rate. It illustrates that the liposome is a novel preparation as the drug delivery for the slow release. It would be wide perspective for the application into the clinic in the future.

Key words: tetramethylpyrazine; tetramethylpyrazine-loaded liposome; quality control; model of release; VEGF gene

川芎嗪, 又称四甲基吡嗪 (tetramethylpyrazine, TMP), 它是从伞形科药用植物川芎的干燥根茎中分离提纯的生物碱单体。具有抗癌^[1]、抗炎^[2]、抗氧化^[3]及抑制白介素-8 表达^[4]等多种药理活性。临床上利用川芎嗪的活血化瘀、抗血小板凝集、扩张血管、抑制氧自由基产生、提高内源性超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、改善血液流变学、抑制纤维化、调节脂质代谢的药理作用, 广泛用于治疗心、脑血

管疾病。

国内外大量文献显示, 川芎嗪对于治疗缺血性中风确切有效。因为它是一种小分子挥发油, 初步实验证明能通过血脑屏障, 这可能是其治疗缺血性脑中风的基础。在脑缺血再灌注损伤模型中, 显示对神经细胞具有保护作用^[5-7], 在临床上广泛于全脑组织^[8]和局部脑组织^[9]的缺血性脑血管疾病的治疗和手术后的康复治疗。在大鼠动脉阻塞引起的脑缺

收稿日期: 2013-05-07

基金项目: 康缘基金 (KYCX201001) 和安徽中医学院自然科学基金(2010zr004A)共同资助。

作者简介: 夏红梅, 女, 讲师, 博士。E-mail: sm_shine@163.com

血性中风模型中, 川芎嗪抑制 α -HIF-1, α -TNF 和活化 caspase-3 的表达^[9]; Kao 等研究在大鼠脑中中风模型中, 川芎嗪对脑具有保护作用^[10]; Fan 等研究家兔脑中中风模型中, 也得到了相同的结论^[11]。Hsiao 等用大鼠中脑动脉阻塞引起的中风模型中, 初步探讨了川芎嗪的作用机制^[12]。这些研究都表明川芎嗪可能参与血管功能的调控, 但它所作用的靶点、调控的信号通路目前还不清楚。

另外, 川芎嗪在体内的半衰期短, 生物利用度低, 这极大地影响了它的临床使用^[13]。本研究将川芎嗪制备成脂质体, 这可能是最好的选择。因为脂质体是种纳米级别的药物载体系统^[14], 能够透过血脑屏障治疗脑中风。同时可以有效地延长川芎嗪的释放^[15], 达到缓释的作用^[16-18], 提高其生物利用度。

1 材料与方法

1.1 试剂

川芎嗪原料(纯度 99%, 购自湖北兴众原料有限公司); HUVEC 细胞(ATCC, 美国模式菌种收集中心); VEGF₁₆₅ (Sigma Co.); MTT (南京生兴生物技术公司); TRIZOL (Invitrogen); Reverse Transcription System (Promega Co.); 胎牛血清(杭州四季青); DMEM 培养基 (HyClone); 大豆卵磷脂和胆固醇(国药集团); 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Q-PCR 仪(7300, AB applied biosystems); 二氧化碳培养箱(Thermo, 美国); 倒置显微镜(奥林巴斯, 日本); Zeta 电位仪(Brookhaven instrument corporation, Zetapuls particle sizing software); 离心机(Thermo, 美国); 酶标仪(TECAN, 瑞士); 紫外分光光度计(2550, 岛津)。

1.3 方法

1.3.1 紫草宁脂质体的制备 川芎嗪脂质体(TMP-L): 川芎嗪(3 mg), 大豆卵磷脂(50 mg), 胆固醇(10 mg), 加入 10 mL 的无水乙醇溶解完全后, 加入到同样体积 70~80 °C 左右不断搅拌的 PBS 缓冲液中, 旋转蒸发直至无水乙醇挥发完全, 呈现为乳浊状溶液, 冷藏或冻干保存。采用部分川芎嗪后加法制备出不同包封率的川芎嗪脂质体(TMP-L₁, TMP-L₂ 和 TMP-L₃) 用于下面的实验研究。

空白脂质体(ck-L): 除了不加药以外, 其他处方和工艺都相同。

1.3.2 用 Zeta 电位仪测定粒径大小、zeta 电位 取样品适量放置 Zeta 电位仪样品池中, 先测大小, 再测电位, 然后用 Zetapuls particle sizing software 进行

分析。

1.3.3 用紫外分光光度法测定川芎嗪脂质体中药物的含量 (1) 制备标准曲线。配制不同浓度的川芎嗪溶液(C, mg·mL⁻¹), 在最大吸收波长处测定吸光度(A)后, 进行线性回归分析, 得标准曲线和相关系数(R)。

(2) 测定样品。准确吸取适量的川芎嗪原料、空白脂质体和川芎嗪脂质体溶液, 加入氯仿充分提取后, 在最大吸收波长处测定吸光度, 带入到标准曲线中计算出川芎嗪脂质体药物含量。

1.3.4 用透析法测定川芎嗪脂质体的包封率 先按 2.3 法测定紫草宁脂质体药物总量, 再用透析袋充分透析后, 测定未被包封药物的量, 两者相减得出脂质体中包封的药物量, 最后与脂质体中药物总量相比, 计算出包封率。计算公式如下:

包封率(%) = 脂质体中包封的药物量 / 脂质体中药物总量 × 100

1.3.5 川芎嗪脂质体对 HUVEC 细胞的抑制作用 (MTT) (1) HUVEC 细胞培养。从液氮罐中取出冻存的 HUVEC 细胞, 在 37°C 水浴中轻摇融化复苏, 将细胞接种到带滤膜的细胞培养瓶中, 加入适量体积含 10% 胎牛血清, 青霉素 100 U·mL⁻¹, 链霉素 100 μg·mL⁻¹ 的 DMEM 培养基中。放置 37°C, 含 5% 二氧化碳的培养箱中进行培养。

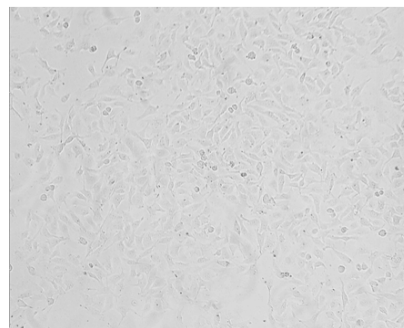


图 1 HUVEC 细胞
Figure 1 HUVEC cells

(2) 消化接种细胞。用 0.25% 胰蛋白酶消化汇合的单层细胞 HUVEC (图 1), 用含 10% 胎牛血清培养液配成单个细胞悬液, 细胞计数后, 按照 1 000~10 000 个细胞·孔⁻¹ 的细胞浓度接种到 96 孔板, 每孔体积 200 μL。然后加入含 0、0.01、0.05、0.25、0.75 和 1.5 mg·mL⁻¹ 川芎嗪的培养基, 进行药物处理。在 37°C, 含 5% 二氧化碳的培养箱中继续培养 2 d。

(3) 呈色。培养规定的时间后, 每孔加 20 μL 浓度为 5 mg·mL⁻¹ 的 MTT 溶液(用 pH 为 7.4 的磷

酸缓冲液 (PBS) 配置而成)。继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 对于悬浮细胞需要离心后再吸弃孔内培养上清液。每孔加 150~200 μL 的二甲基亚砜 (DMSO), 振荡 10 min, 使结晶物充分融解。

(4) 比色。选择 570 nm 为测定波长, 450 nm 为参比波长。在酶联免疫分析仪上测定各孔光吸收值, 记录结果, 每个浓度重复 4 次, 计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

1.3.6 川芎嗪脂质体对 HUVEC 细胞 VEGF 基因的抑制作用 HUVEC 细胞培养 (同上)。

消化接种细胞。用胰蛋白酶消化汇合的单层 HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), 用含 10% 胎牛血清培养液配成单个细胞悬液, 细胞计数后, 接种到 6 孔板, 每孔体积 2 000 μL (含 20 ng VEGF_{165})。在 37 $^{\circ}\text{C}$, 含 5% 二氧化碳培养箱中进行培养。

加药处理。加入同样浓度 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的川芎嗪 (TMP) 及不同包封率的川芎嗪脂质体 (TMP-L1, TMP-L2, TMP-L3) 进行处理 (不加药组为 ck), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 含 5% 二氧化碳的培养箱中继续培养。

提取总 RNA。按照 TRIZOL 法说明书, 提取 6 孔板中培养的 HUVEC 总 RNA。

cDNA 第一链的合成 (反转录)。按照 Reverse Transcription System (Promega Co.) 说明书中提供的方法进行 cDNA 第一链的合成, 具体步骤如下:

(1) 于 PCR 管中依次加入 1 μg 总 RNA、1 μL Oligo(dT)₁₅ Primer, 用 DEPC H₂O 补充至 17 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 取出后立即置于冰上 2 min 以上;

(2) 按顺序依次准备共 25 μL 的反应液: 上述 17 μL 混合物, 5 μL 的 5 \times Reverse Transcription Buffer, 1.25 μL 的 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP mixture, 0.75 μL 的 RNase Inhibitor (40 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 和 1 μL 的 M-MLV Reverse Transcriptase (25 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$);

(3) 置于 PCR 仪中 42 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 15 min。合成好的 cDNA 第一链放置在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

Real time PCR。实时定量 Q-PCR 分析中, 使用光学透性的 96 孔微量板。cDNA 样品稀释 12 倍后吸取 4 μL 作为模板, 加入到 20 μL 的 PCR 反应体系中, 包含 3 μL 上游引物, 3 μL 下游引物, 以及 10 μL SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix (No. QPK-201, Toybo Co., Ltd., Osaka, Japan), 混匀。反应在 ABI 公司的 7300 实时定量 PCR 仪中进行, 每个样品做 3 个平行反应。设定程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1

min, 然后 40 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s。

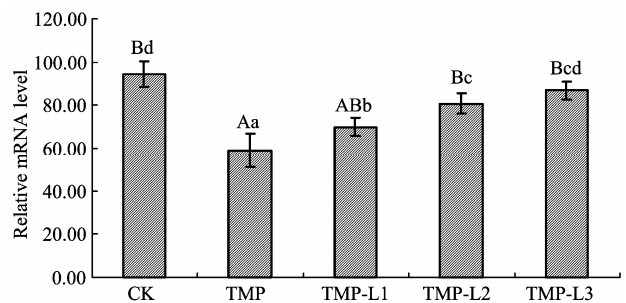
以 GAPDH 为内参基因 (sense primer 5'-TGCA CCACCAACTGCTTA-3'; anti-sense primer 5'-GGA TGCAGGGATGATGTTC-3'), 采用相对定量法对 VEGF 基因 (sense primer 5'-GAGTACCCTGATGA GATCGAGT-3'; anti-sense primer 5'-ATTTGTTGTG CTGTAGGAAGCT-3') 表达模式进行分析。首先以内参基因 GAPDH 为标准, 用公式 ΔCt (specific gene) = Ct (specific gene) - Ct (GAPDH) 对目的基因在不同处理时间点的转录水平进行均一化处理, 然后以其中最小的 ΔCt 值为标准, 根据算式 $100 \times 2^{-[\Delta Ct$ (specific gene) - ΔCt (specific gene) the lowest level]} 来计算的相对 mRNA 值。进行 2 次生物学重复, 因结果类似, 只列出其中一次的结果。

统计分析。用 SPSS13.0 软件中的 one-way ANOVA test 项下的最小显著差数法 (the least significant differences, LSD) 进行均数的多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 用 Zeta 电位仪测定粒径大小、zeta 电位分析

Zeta 电位仪测定分析了 3 批川芎嗪脂质体样品的粒径为 134.9 \pm 12.4、165.7 \pm 14.1 和 198.6 \pm 13.8 nm。电位为 -33.22 \pm 2.73、-35.37 \pm 3.58 和 -38.95 \pm 4.76 mV。



图中用不同大写字母和小写字母分别表示不同处理间在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平上的显著性差异

Different capital and small letters mean significant difference at $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively

图 2 川芎嗪及其脂质体对 HUVEC 细胞 VEGF 基因的下调作用

Figure 2 Tetramethylpyrazine and tetramethylpyrazine-loaded liposomes downregulate the VEGF gene of HUVEC

2.2 紫外分光光度法测定川芎嗪脂质体含量结果

2.2.1 标准曲线

$$A = 46.157 C - 0.0094 \quad (R = 0.9991)$$

2.2.2 川芎嗪脂质体含量测定结果 在 295 nm 处测定川芎嗪脂质体的含量为 0.32 \pm 0.01、0.31 \pm 0.01 和 0.33 \pm 0.02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

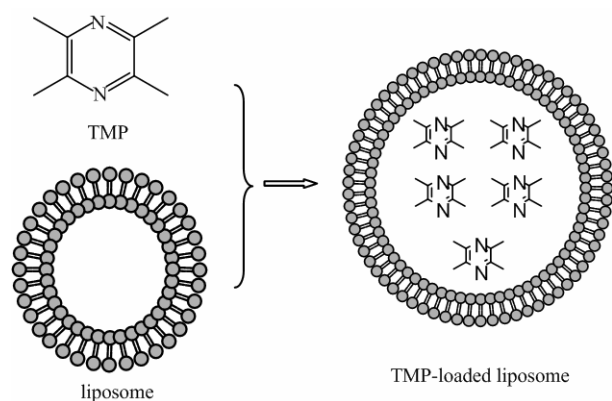


图 3 川芎嗪脂质体示意图

Figure 3 Schematic diagram of tetramethylpyrazine-loaded liposome (TMP-loaded liposome)

2.3 包封率测定

脂质体的包封率是个比较重要的药物制剂学指标, 一般采用透析法、葡聚糖凝胶、超速离心法及超滤法等分离方法将溶液中游离药物和脂质体进行分离, 分别测定, 计算包封率, 通常要求脂质体的药物包封率达 80% 以上。

用透析法测定川芎嗪脂质体的包封率, 结果为 $43.89\% \pm 3.88\%$ 、 $61.23\% \pm 4.71\%$ 和 $84.35\% \pm 6.67\%$ 。

2.4 川芎嗪及其脂质体对 HUVEC 细胞抑制作用

川芎嗪及其脂质体作用 HUVEC 细胞后, 各组之间没有统计学差别 ($P < 0.05$), 说明川芎嗪及其脂质体对 HUVEC 抑制作用很弱。

2.5 川芎嗪及其脂质体对 HUVEC 细胞 VEGF 基因的下调作用

实验结果显示, 在加入 VEGF₁₆₅ 因子培养 HUVEC 一段时间后, 加入川芎嗪及其脂质体后。除了 CK 和 TMP-L3 以及 TMP-L2 和 TMP-L3 之间没有显著性差别以外, 其他各组之间都有显著性差异 ($P < 0.05$) 或非常显著性差异 ($P < 0.01$)。从分子水平上表明川芎嗪及其脂质体对 VEGF₁₆₅ 因子诱导后 HUVEC 细胞中 VEGF 基因有下调作用, 川芎嗪脂质体能减少川芎嗪对 VEGF 基因的下调作用 (图 2)。从药理活性上表明川芎嗪及其脂质体对血管新生有抑制作用, 川芎嗪脂质体减轻对血管新生的抑制作用。并且随着包封率的增加, 这种减轻作用会更加明显

3 讨论

脂质体将药物包裹在磷脂双分子结构中, 粒径成纳米级别。它是一种模拟细胞膜结构的类生物膜结构, 由双分子层磷脂构成 (图 3)。此剂型除具有

缓慢释放的性质, 还具有良好的生物亲和性, 免疫原性小、无毒、持续时间长、定向分布、靶向性等特点, 可提高治疗指数, 降低毒副作用。

目前, 药物脂质体研究属于药物制剂前沿科学, 有较强的新颖性。Matters 等人在研究中, 采用胃泌素的 siRNA 制备成纳米脂质体转染到靶细胞中进行研究, 取得了一定的科研成果^[19]。TMPahzad 等研究人员采用 DOPC 纳米脂质体将针对 FAK 和 Src 的 siRNA 导入到靶细胞中, 进行基因敲除研究^[20]。Zhang 等采用纳米脂质体给药系统辅助以热疗技术, 发现热疗可以促进药物纳米脂质体对微脉系统的渗透作用, 而且可以刺激药物分布在靶细胞周围^[21]。Khazanov 等研究了包裹神经酰胺的纳米脂质体的物理化学和生物学的特性等^[22]。

布朗大学生物学家 Gary Wessel 博士所领导的研究小组, 就尝试着利用海胆(urchin)的卵子(eggs)细胞, 来分析膜融合的瞬间, 就卵子受精的过程, 来分析胞膜融合的过程^[23]。研究人员表示下一个阶段的研究, 就是如何的把这—个发现, 应用到药物的输送上。川芎嗪脂质体双分子脂质结构和靶细胞可能通过膜融合的方式介导药物释放到靶细胞发挥疗效 (图 2)。本研究是用脂质体作为抗中风和抗肿瘤药物的传输载体, 是将上述的科研成果真正的得以应用。脑细胞、肿瘤细胞或其他靶细胞上可能存在识别蛋白, 当脂质体和靶细胞相接触时, 触发一系列信号传导后, 引起膜融合作用的发生。

在中风发生过程中, 开始在中风病灶周围会有血管新生, 是为了更多的给中风部位提供氧气和养料。但这种新生血管细胞之间连接不紧密, 会造成后期的脑水肿。而在肿瘤生长过程中, 血管新生是一个包括毛细血管基底膜的降解, 内皮细胞的迁移和增殖以及小管腔形成等复杂的过程。两者都与血管新生有着密切的。VEGF 在血管新生中是最重要的分裂原, 它和内皮细胞膜表面受体相作用时, 会引起受体二聚化, 进而激活细胞内酪氨酸激酶的活性, 触发下游的多个信号通路, 促进血管新生^[24-26]。故 VEGF (vascular endothelial growth factor)/VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) 在血管新生中起着中枢调节的重要作用^[27-28]。川芎嗪及其脂质体抑制 VEGF₁₆₅ 诱导的血管内皮细胞中 VEGF 基因的表达, 也就抑制了 VEGF 信号传导途径, 从而通过抑制血管新生来抑制脑中后期的脑水肿和肿瘤生长。

在研究川芎嗪及其脂质体对 HUVEC 细胞 VEGF 基因的影响时, 同样剂量的川芎嗪和川芎嗪

脂质体同时给药,作用相同的时间取样检测,川芎嗪对 *VEGF* 基因表达的抑制作用要比其脂质体强。这是由于脂质体中药物从载体脂质体中缓慢释放引起的^[29],川芎嗪脂质体实际上起作用的药物量要比川芎嗪组小,故产生的药效也就相对会弱些,充分说明川芎嗪脂质体是种可以缓慢释放,延长药物作用时间,提高生物利用度的优良剂型。

参考文献:

- [1] Chen L, Lu Y, Wu J M, et al. Ligustrazine inhibits B16F10 melanoma metastasis and suppresses angiogenesis induced by Vascular Endothelial Growth Factor[J]. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 2009, 386(2): 374-379.
- [2] Sue Y M, Cheng C F, Chang C C, et al. Antioxidation and anti-inflammation by haem oxygenase-1 contribute to protection by tetramethylpyrazine against gentamicin-induced apoptosis in murine renal tubular cells[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2009, 24(3): 769-777.
- [3] Kang Y X, Hu M H, Zhu Y H, et al. Antioxidative effect of the herbal remedy Qin Huo Yi Hao and its active component tetramethylpyrazine on high glucose-treated endothelial cells[J]. *Life Sciences*, 2009, 84(13-14): 428-436.
- [4] Li X Y, He J L, Liu T, et al. Tetramethylpyrazine suppresses interleukin-8 expression in LPS-stimulated human umbilical vein endothelial cell by blocking ERK, p38 and nuclear factor- κ B signaling pathways[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 125(1): 83-89.
- [5] Cheng X R, Zhang L, Hu J J, et al. Neuroprotective effects of tetramethylpyrazine on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells[J]. *Cell Biology International*, 2007, 31(5):438-443.
- [6] Yang J, Li J, Lu J, et al. Synergistic protective effect of astragaloside IV-tetramethylpyrazine against cerebral ischemic-reperfusion injury induced by transient focal ischemia[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 140(1): 64-72.
- [7] Gao C, Liu X Z, Liu W, et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of tetramethylpyrazine following subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical*, 2008, 141(1/2): 22-30.
- [8] Luo X X, Ogata H, Xu X, et al. Protective effect of tetramethylpyrazine on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus[J]. *No To TMPinkei*, 1994, 46(9): 841-846.
- [9] Chang Y, Hsiao G, Chen S H, et al. Tetramethylpyrazine suppresses HIF-1 α , TNF- α , and activated caspase-3 expression in middle cerebral artery occlusion-induced brain ischemia in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(3): 327-333.
- [10] Kao T K, Ou Y C, Kuo J S, et al. Neuroprotection by tetramethylpyrazine against ischemic brain injury in rats[J]. *Neurochemistry International*, 2006, 48(3): 166-176.
- [11] Fan L H, Wang K Z, Cheng B, et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of tetramethylpyrazine following spinal cord ischemia in rabbits[J]. *BMC Neuroscience*, 2006, 14(7): 48.
- [12] Hsiao G, Chen Y C, Lin J H, et al. Inhibitory mechanisms of tetra methylpyrazine in middle cerebral artery occlusion (MCAO)-induced focal cerebral ischemia in rats[J]. *Planta Medica*, 2006, 72(5): 411-417.
- [13] Feng J, Li F Z, Zha Y M, et al. Brain pharmacokinetics of tetramethylpyrazine after intranasal and intravenous administration in awake rats[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 375(1/2): 55-60.
- [14] Gosk S, Moos T, Gottstein C, et al. VCAM-1 directed immunoliposome selectively target tumor vasculature in vivo[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2008, 1778(4): 854-863.
- [15] Allen T M. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1994, 13(3): 285-309.
- [16] Mumper R J, Hoffman A S. The stabilization and release of hirudin from liposomes or lipid-assemblies coated with hydrophobically modified dextran[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2000, 1(1): 20-29.
- [17] Xia H M, Tang C Y, Gui H, et al. Preparation, cellular uptake and angiogenic suppression of TMPikinin-containing liposomes in vitro and in vivo[J]. *Bioscience Reports*, 2013, 33(2): 207-215.
- [18] Hong M H, Zhu S J, Jiang Y Y, et al. Novel anti-tumor strategy: PEG-hydroxycamptothecin conjugate loaded transferrin-PEG-nanoparticles[J]. *Journal of Controlled Release*, 141(1): 22-29.
- [19] Matters G L, Harms J F, McGovern C O, et al. Growth of human pancreatic cancer is inhibited by down-regulation of gastrin gene expression[J]. *Pancreas*, 2009, 38(5): E151-E161.
- [20] Shahzad M M, Lu C, Lee J W, et al. Dual targeting of EphA2 and FAK in ovarian carcinoma[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2009, 8(11): 1027-1034.
- [21] Zhang A L, Mi X P, Yang G, et al. Numerical study of thermally targeted liposomal drug delivery in tumor[J]. *Journal of Heat Transfer-Transactions of the Asme*, 2009, 131(4): 043209-0432010.
- [22] Khazanov E, Prieve A, Shillemans J P, et al. Physicochemical and biological characterization of ceramide-containing liposomes: Paving the way to ceramide therapeutic application[J]. *Langmuir*, 2008, 24(13): 6965-6980.
- [23] Wong J L, Koppel D E, Cowan A E, et al. Membrane hemifusion is a stable intermediate of exocytosis[J]. *Developmental Cell*, 2007, 12(4): 653-659.
- [24] Beck H, Plate K H. Angiogenesis after cerebral ischemia[J]. *Acta Neuropathologica*, 2009, 117(5): 481-496.
- [25] Breier G. Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system[J]. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2000, 26(5): 553-559.
- [26] TMPin Y J, Choi J S, Choi J Y, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 in the subventricular zone of stroke-lesioned rats[J]. *Neuroscience Letters*, 2010, 469(2): 194-198.
- [27] Jung M H, Lee S H, Ahn E M, et al. Decursin and decursinol angelate inhibit VEGF-induced angiogenesis via suppression of the VEGFR-2-signaling pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(4): 655-661.
- [28] Jang Y S, Lee E O, Lee H J, et al. Bojungbangdocktang inhibits vascular endothelial growth factor induced angiogenesis via blocking the VEGF/VEGFR2 signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54(2): 227-233.
- [29] Kizelsztejn P, Ovadia H, Garbuzenko O, et al. Pegylated nanoliposomes remote-loaded with the antioxidant tempamine ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2009, 213(1/2): 20-25.