

· 论著 ·

依托泊苷壳聚糖胶束的制备及壳聚糖促进依托泊苷肠吸收作用的研究

陈松, 王彧杰, 王欢, 原永芳 (上海市第九人民医院药剂科, 上海 201999)

[摘要] **目的** 制备依托泊苷壳聚糖胶束, 并研究壳聚糖对依托泊苷肠吸收的促进作用。**方法** 用透析法制备依托泊苷壳聚糖胶束, 建立依托泊苷 HPLC 含量测定方法, 测定了其包封率与载药量; 采用大鼠在体肠循环实验, 研究不同剂量壳聚糖对依托泊苷全肠段和各个肠段吸收的影响。**结果** 壳聚糖胶束平均粒径为 139.5 nm, 多分散系数为 0.569; 依托泊苷标准曲线为 $A = 8436.8C - 4963.8$, $r = 1.0000$, 日内、日间精密度符合要求; 包封率为 $(47.3 \pm 2.84)\%$, 载药量为 $(1.10 \pm 1.27)\%$; 随着壳聚糖浓度的增加, 依托泊苷在全肠段的单位面积吸收量有不同程度的增加; 壳聚糖对依托泊苷的吸收促进作用存在着肠道特异性, 作用大小顺序: 回肠 > 空肠 > 十二指肠。**结论** 在十二指肠、空肠和回肠, 壳聚糖都不同程度促进了药物的吸收, 且在空肠和回肠有显著性的影响。

[关键词] 壳聚糖; 依托泊苷; 肠吸收

[中图分类号] R979.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)03-0243-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.012

Preparation of the etoposide chitosan micelle and the effect of chitosan on etoposide intestinal absorption

CHEN Song, WANG Yujie, WANG Huan, YUAN Yongfang (Department of Pharmacy, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai 201999, China)

[Abstract] **Objective** To prepare the etoposide chitosan micelle, and investigate the effect of chitosan on etoposide intestinal absorption. **Methods** The etoposide chitosan micelle was prepared by dialysis. The drug encapsulation efficiency and drug loading efficiency were determined by HPLC. The intestine in rats was cannulated for in situ recirculation. The effects of different chitosan doses on the intestinal drug absorption and the effects of chitosan on the drug absorption at different intestinal locations were studied. **Results** The average particle size of etoposide chitosan micelle was 139.5 nm. The multi-dispersion coefficient was 0.569. The standard curve of etoposide was $A = 8436.8C - 4963.8$, $r = 1.0000$. The intra- and inter-day precision values meet the requirement. The drug encapsulation efficiency was $(47.3 \pm 2.84)\%$ and drug loading efficiency was $(1.10 \pm 1.27)\%$. With the increase of the chitosan concentration, the absorption capacity of the unit area in the whole intestine was increased in different degrees. Chitosan exhibits its effects on etoposide absorption at different intestinal sections in the following order: ileum > jejunum > duodenum. **Conclusion** Chitosan promoted etoposide absorption in duodenum, jejunum and ileum, especially in jejunum and ileum.

[Key words] chitosan; etoposide; intestinal absorption

依托泊苷主要用于治疗小细胞肺癌、淋巴瘤、睾丸肿瘤、急性粒细胞白血病, 对卵巢癌、乳腺癌、神经母细胞瘤亦有效。目前临床剂型有注射剂和口服固体制剂(胶囊剂), 但由于其水溶性差、溶出慢而导致常规口服制剂的生物利用度差。而且依托泊苷为 P-糖蛋白底物, 在肠吸收过程中会发生 P-糖蛋白外

排现象, 这也是造成口服制剂生物利用度低的原因之一^[1,2]。而壳聚糖及其衍生物对难溶性药物能起到增溶作用, 且对药物跨上皮黏膜细胞的透过能力有很强的促进作用, 是一种较为安全和有效的吸收促进剂^[3,4]。因此, 我们制备了依托泊苷壳聚糖胶束, 并采用在体肠循环法研究壳聚糖对依托泊苷肠吸收的促进作用。

1 仪器与材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪(LC-10AT, 岛津公司); TOLEDO 320 pH 计(METTLER TOLEDO);

[作者简介] 陈松, 本科, 药师, 研究方向: 药理学. Tel: (021) 56691101; Email: cs9616@163.com

[通讯作者] 原永芳, 博士, 主任药师, 研究方向: 药理学. Email: nmxyy@126.com

HL-2B型数显恒流泵(上海沪西分析仪器厂);HH-2数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);Zetasizer激光粒度仪(马尔文公司)。

1.2 材料 依托泊苷(上海现代制药股份有限公司,纯度99.8%);壳聚糖(南通绿神生物工程有限公司);氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、磷酸氢二钠、葡萄糖、碳酸氢钠、硫酸镁、磷酸(分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司);甲醇(高效液相纯,购自国药集团化学试剂有限公司);Hanks缓冲液(pH6.8);每1000 ml含NaCl 8.0 g、KCl 0.4 g、CaCl₂ 0.14 g、MgCl₂·6H₂O 0.10 g、Na₂HPO₄·7H₂O 0.09 g、葡萄糖 1.0 g、NaHCO₃ 0.35 g、MgSO₄·7H₂O 0.1 g、KH₂PO₄ 0.06 g,用1.0 mol/L H₃PO₄调节pH至6.8;雄性SD大鼠,体质量200~300 g(中国药科大学动物房)。

2 实验方法

2.1 依托泊苷壳聚糖胶束的制备 精密称取壳聚糖12 mg,将其溶解在纯水中,超声30 min使分散均匀,逐步将一定量的依托泊苷二甲基甲酰胺溶液加入到壳聚糖溶液中,超声30 min,将混合物装入透析袋中,放入去离子水中透析过夜,透析结束后移出袋内胶束溶液,过0.8 μm滤膜,即得。

2.2 粒径考察 取“2.1”项下制备的依托泊苷壳聚糖胶束,加3倍体积纯水稀释,于25℃下,使用Zetasizer激光粒度仪测定粒径及多分散性。

2.3 依托泊苷的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(55:45,V/V);检测波长:285 nm;流速:1 ml/min;柱温:25℃;进样量:20 μl。

2.3.2 依托泊苷标准曲线的绘制 精密称取依托泊苷11.3 mg,置100 ml容量瓶中,用甲醇定容至刻度,分别从中移取0.1、0.5、1、2、4、5 ml置10 ml容量瓶中,用甲醇定容至刻度,得到1.13、5.65、11.3、22.6、45.2、56.5 μg/ml系列浓度溶液,分别进样,记录依托泊苷峰面积A,以依托泊苷浓度C(μg/ml)为横坐标,依托泊苷峰面积A为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程。

2.3.3 精密度 取“2.3.2”项制备的1.13、11.3、56.5 μg/ml浓度的溶液,分别进样5次,并连续5 d每日各测定一次,考察该方法测定依托泊苷含量的精密度。

2.3.4 包封率与载药量的测定 将透析法制备后的依托泊苷壳聚糖胶束溶液过0.8 μm滤膜,分别

于过膜前后精密移取依托泊苷壳聚糖胶束溶液1 ml,以甲醇溶解并稀释至10 ml,用HPLC法测定载药胶束中药物的峰面积,经标准曲线计算胶束中药物的浓度及含量,按下式计算包封率和载药量:

包封率(DEE)=过膜后药物含量/过膜前药物含量×100%

载药量(DLE)=胶束中实测药量/载药胶束总量×100%

2.4 在体肠循环实验

2.4.1 药物在肠循环液中的稳定性 用新鲜配制的Hanks缓冲液(pH6.8)模拟大鼠肠循环液,并用其配制一定浓度的依托泊苷壳聚糖溶液,于37℃水浴,分别在0、0.5、1、1.5、2 h取点,测定药物浓度的变化,考察药物在肠循环液中的稳定性。

2.4.2 药物在各个肠段的物理吸附 将大鼠的4个空白肠段各剪取约10 cm,将其翻转后置于50 ml用Hanks缓冲液(pH6.8)配制的一定浓度的依托泊苷壳聚糖胶束溶液中,于37℃孵化2 h,取出肠段后,测定孵化前后溶液的浓度和各个肠段的面积,计算各个肠段单位面积的物理吸附量。

4个空白肠段的选取如下:①十二指肠段:离幽门1 cm处开始选取;②空肠段:离幽门15 cm处开始选取;③回肠段:距离盲肠上行处20 cm开始选取;④结肠段:从盲肠后段开始选取。

2.4.3 大鼠在体肠循环实验方法^[5,6] 为了研究药物是否具有特定部位吸收,将禁食24 h(自由饮水)的大鼠用20%乌拉坦(0.6 ml/100 g)腹腔注射麻醉,背部固定在手术台上,沿腹部正中中线切开约3 cm的开口。在十二指肠上部剪一V形开口,插入带有特制玻璃插管的硅胶管,并用细线扎紧,再往下约10 cm处剪一V形口,插入另一硅胶管,用细线扎紧。打开恒流泵,通入生理盐水冲洗肠管。同样的方法分别在空肠、回肠、结肠的上下段进行插管。等排掉生理盐水后,将每个肠段插管的进口和出口分别置于50 ml容量瓶中,进口浸入液面以下,出口在液面以上,容量瓶中装有Hanks缓冲液(pH6.8)配制的一定浓度的25 ml依托泊苷壳聚糖胶束溶液且容量瓶置于37℃水浴中。打开恒流泵开始循环,并记时,过2 h后,停止回流,用空白Hanks缓冲液冲洗各个循环管道,用50 ml容量瓶接收冲洗液,合并剩余肠循环液,并用空白Hanks缓冲液定容到50 ml,样品处理后,进样。撤掉装置后,测定各个循环肠段的面积,比较各个肠段的单位面积药物吸收量,单位面积药物吸收量按下式计算:

$$I = (25 \times C_1 - 50 \times C_2) / S$$

其中, I : 单位面积药物吸收量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$); C_1 : 回流前药液的浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$); C_2 : 回流后药液的浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$); S : 肠段的面积 (cm^2)。

实验装置见图 1。

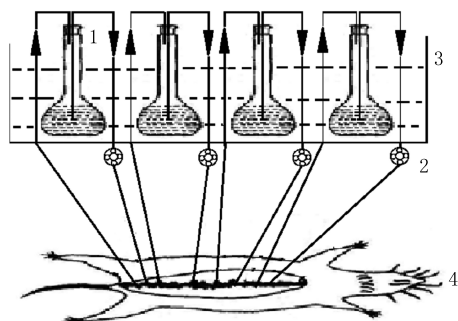


图 1 大鼠肠循环原理图

1. 容量瓶; 2. 恒流泵; 3. 加热装置; 4. 大鼠

2.4.4 不同浓度的壳聚糖对依托泊苷肠吸收的影响 分别配制壳聚糖浓度为 0.1%、0.6%、1% (W/V) 的依托泊苷壳聚糖胶束, 用 Hanks 缓冲液 (pH6.8) 稀释胶束溶液至依托泊苷浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, 并用 Hanks 缓冲液 (pH6.8) 配制成浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的依托泊苷溶液 (即不含壳聚糖的依托泊苷溶液) 作为对照, 采用“2.4.3”项下方法, 比较循环前后药液中药量的减少量 (即吸收量), 循环结束后, 测量全肠段的面积, 比较不同浓度的壳聚糖对依托泊苷肠吸收的影响。

2.4.5 壳聚糖对依托泊苷各肠段吸收的促进作用 配制壳聚糖浓度为 0.6% (W/V) 的依托泊苷壳聚糖胶束, 用 Hanks 缓冲液 (pH6.8) 稀释胶束溶液至依托泊苷浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, 并用 Hanks 缓冲液 (pH6.8) 配制成浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的依托泊苷溶液 (即不含壳聚糖的依托泊苷溶液) 作为对照, 采用“2.4.3”项下方法, 比较循环前后药液中药量的减少量 (即吸收量), 循环结束后, 测量各肠段的面积, 比较壳聚糖对依托泊苷在各肠段吸收的促进作用。

3 结果

3.1 粒径 由图 2 可见, 平均粒径为 139.5 nm , 多分散系数 0.569。

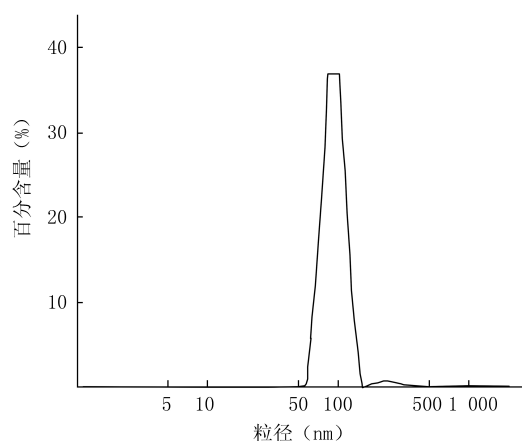


图 2 依托泊苷壳聚糖胶束粒径分布

3.2 含量测定

3.2.1 标准曲线的绘制 按照“2.3.2”项下方法测定, 以依托泊苷峰面积 (A) 为纵坐标, 依托泊苷浓度 (C) 为横坐标, 得到回归方程 $A = 8436.8 C - 4963.8$, $r = 1.0000$, 结果表明依托泊苷在 $5.05 \sim 70.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度区间内线性良好。

3.2.2 精密度实验 取 1.13、11.3、56.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的溶液, 日内差每隔 2 h 进样一次, 共测 5 次; 日间差每日测定一次, 连续测定 5 d。结果表明, 日间、日内精密度均符合要求, $\text{RSD} < 2\%$ (表 1)。

表 1 依托泊苷的日内和日间精密度 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

药物浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	精密度 (%)	
	日内	日间
1.13	98.86 ± 1.1	99.11 ± 1.3
11.3	99.23 ± 0.4	99.24 ± 1.2
56.5	98.78 ± 0.2	99.05 ± 1.0

3.2.3 包封率与载药量 按“2.3.4”项下公式计算得到依托泊苷壳聚糖胶束的包封率为 $(47.3 \pm 2.84)\%$, 载药量为 $(1.10 \pm 1.27)\%$ 。

3.3 在体肠循环吸收实验的结果

3.3.1 药物在肠循环液中的稳定性 将 50 ml 供试液置于循环装置中, 在与实验相同的条件下循环 2 h, 结果表明药物在实验时间内在肠循环液中的含量没有明显变化 (表 2)。

表 2 药物在肠循环液中的稳定性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间	药物含量 (%)				
	0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
循环前	99.32 ± 0.17	99.64 ± 0.23	99.01 ± 0.26	99.34 ± 0.07	99.54 ± 0.18
循环后	99.74 ± 0.20	99.53 ± 0.27	98.83 ± 0.09	99.11 ± 0.35	99.74 ± 0.20

3.3.2 药物在各肠段的物理吸附 表3结果表明,各肠段对药物无物理吸附,基本可以排除药物在各肠段的物理吸附对实验的干扰。

表3 药物在各肠段的物理吸附($\bar{x} \pm s, n=3$)

肠段	吸附前药物含量(%)	吸附后药物含量(%)
十二指肠	99.13±0.625	99.43±0.475
空肠	99.45±0.15	99.29±0.19
回肠	99.38±0.005 9	99.64±0.007 5
结肠	99.21±0.78	99.09±0.53

3.3.3 不同浓度的壳聚糖对依托泊苷肠吸收的影响 实验结果见表4。

表4 不同浓度的壳聚糖对
依托泊苷肠吸收的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

壳聚糖浓度(%, W/V)	单位面积药物平均吸收量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
0	4.5 ± 0.16
0.10	7.23 ± 2.49
0.60	12.23 ± 1.88
1.00	11.14 ± 2.51

结果表明,随着壳聚糖浓度的增加,依托泊苷的单位面积吸收量有着不同程度的增加,当壳聚糖浓度增加到0.60%(W/V)时,单位面积吸收量达最高,与不含壳聚糖的依托泊苷的吸收相比有显著性差异($P < 0.05$),但与壳聚糖浓度1.00%(W/V)相比没有显著性差异。

3.3.4 壳聚糖对依托泊苷在不同肠段吸收的影响 实验结果见表5。

表5 壳聚糖对依托泊苷在
不同肠段吸收的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

肠段	单位面积药物平均吸收量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
	0%壳聚糖浓度	0.60%壳聚糖浓度
十二指肠	5.52±2.29	5.91±2.28
空肠	5.33±2.18	12.34±2.58
回肠	4.98±2.86	18.15±4.47
结肠	0	0

结果表明,在十二指肠、空肠和回肠,壳聚糖都不同程度促进了药物的吸收,且在空肠和回肠较不含壳聚糖的依托泊苷的吸收存在显著性差异($P < 0.05$),表明壳聚糖对依托泊苷在空肠和回肠处的促吸收作用较强,且在回肠段的促吸收作用大于空肠段。

4 结论

近年来研究发现壳聚糖具有较好的生物黏附性、促吸收效应和酶抑制载体作用等特性。而随着对壳聚糖C2-NH₂,C3-仲OH和C6-伯OH活性基团的改性研究的深入,人们发现其衍生物具有更强大的生物黏附性、促吸收和酶抑制载体的功用。壳聚糖的生物黏附性可以延长药物在吸收部位的停留时间;增强与吸收黏膜的结合产生较大药物浓度梯度从而利于药物的吸收;药物固定在特殊区域,改善或提高药物的生物利用度。对于大多数吸收促进剂来说,细胞毒性是明显的,而关于壳聚糖的安全性则得到相反的结果^[7]。Carreno-Gomez等^[8]利用一系列的显微镜技术研究了pH6.0~6.5的壳聚糖(脱乙酰化程度为80%)溶液对Caco-2细胞单层的结构和功能的影响,结果表明壳聚糖对紧密结构的通透性有瞬间影响而不影响细胞的生存力。壳聚糖能轻微地扰动浆膜,但这种影响是可逆的。

本研究选取壳聚糖,制备了依托泊苷壳聚糖胶束,在前期实验中比较了3种聚合物胶束常用的制备方法^[9]:直接溶解法、透析法、水包油乳化溶剂蒸发法,最终选择了包封率与载药量较高的透析法。该法制备工艺简单,平均粒径为139.5 nm,多分散系数0.569,包封率为(47.3±2.84)%,载药量为(1.10±1.27)%。并对该胶束的肠吸收做了全面的研究,发现壳聚糖对依托泊苷的促吸收作用存在着肠道特异性,作用大小顺序:回肠>空肠>十二指肠,其中在空肠和回肠,壳聚糖促进依托泊苷吸收作用显著,因P-糖蛋白在肠道内的分布有一定规律^[10,11],在肠道下端的分布较为密集,所以实验结果间接表明壳聚糖可能具有P-糖蛋白抑制作用。接下来仍需要进一步深入研究,如:①如何提高胶束的包封率与载药量;②实验将通过在循环液中加入P-糖蛋白抑制剂,多药耐药相关蛋白2(MRP2)抑制剂,能量抑制剂等,进一步考察壳聚糖促进依托泊苷吸收的机制,希望能找到壳聚糖及其衍生物在胃肠道的吸收机制。

【参考文献】

- [1] Li M, Si L, Pan H, et al. Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: assessed *in vitro* by everted gut sac and *in situ* by improved intestinal perfusion [J]. Int J Pharm, 2011, 403(1-2):37-45.
- [2] Choo E, Leake B, Wandel C, et al. Pharmacological inhibition of P-GP transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes [J]. Drug Metab Dis-

- pos, 2000, 28(6): 655-660.
- [3] Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient [J]. *Pharm Res*, 1998, 15(9): 1326-1331.
- [4] Kotze AR, Lueben HL, Leeuw BJD, *et al.* N-trimethyl chitosan chloride as a potential absorption enhancer across mucosal surface: *in vitro* evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2) [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(9): 1197-1202.
- [5] 姚静, 卢韵, 周建平, 等. 川陈皮素自微乳的制备及其大鼠在体肠吸收动力学 [J]. *中国药科大学学报*, 2007, 38(1): 35-38.
- [6] 袁泉, 李馨儒, 王会娟, 等. 水飞蓟素微乳大鼠在体小肠吸收的动力学 [J]. *药学学报*, 2004, 39(8): 631-634.
- [7] Polnok A, Verhoef JC, Borchard G, *et al.* *In vitro* evaluation of intestinal absorption of desmopressin using drug-delivery systems based on superporous hydrogels [J]. *Int J Pharm*, 2004, 269(2): 303-310.
- [8] Carreno-Gomez B, Duncan R. Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres [J]. *Int J Pharm*, 1997, 148(2): 231-240.
- [9] 陈芳, 李娟. 聚合物胶束载药制备方法研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2014, 10(8): 48-49.
- [10] Wagner D, Spahn-Langguth H, Hanafy A, *et al.* Intestinal drug efflux: formulation and food effects [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 50 (Suppl 1): S13-31.
- [11] 贺云霞, 孙进, 程刚. 多药耐药性 P-糖蛋白在药物肠道吸收中的作用 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2004, 21(5): 389-393.
- [收稿日期] 2016-05-15 [修回日期] 2016-11-13
[本文编辑] 顾文华
-
- (上接第 196 页)
- [19] Al-Assar O, Mantoni T, Lunardi S, *et al.* Breast cancer stem-like cells show dominant homologous recombination due to a larger S-G2 fraction [J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 11(12): 1028-1035.
- [20] Zhang M, Behbod F, Atkinson RL, *et al.* Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(12): 4674-4682.
- [21] Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response [J]. *Nature*, 2006, 444(7120): 756-760.
- [22] Yin H, Glass J. The phenotypic radiation resistance of CD44⁺/CD24^{-/low} breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24080.
- [23] Teng Y, Wang X, Wang Y, *et al.* Wnt/beta-catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 392(3): 373-379.
- [24] Wang Y, Krivtsov AV, Sinha AU, *et al.* The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML [J]. *Science*, 2010, 327(5973): 1650-1653.
- [25] Martins-Neves SR, Paiva-Oliveira DI, Wijers-Koster PM, *et al.* Chemotherapy induces stemness in osteosarcoma cells through activation of Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(2): 286-295.
- [26] Catalano V, Dentice M, Ambrosio R, *et al.* Activated thyroid hormone promotes differentiation and chemotherapeutic sensitization of colorectal cancer stem cells by regulating Wnt and BMP4 signaling [J]. *Cancer Res*, 2015, 76(5): 1237-1244.
- [27] Fang L, Zhu Q, Neuenschwander M, *et al.* A small-molecule antagonist of the beta-catenin/TCF4 interaction blocks the self-renewal of cancer stem cells and suppresses tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2015, 76(4): 891-901.
- [28] Wang X, Ma Z, Xiao Z, *et al.* Chk1 knockdown confers radiosensitization in prostate cancer stem cells [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(6): 2247-2254.
- [29] Liu YP, Yang CJ, Huang MS, *et al.* Cisplatin selects for multidrug-resistant CD133⁺ cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1): 406-416.
- [30] Mcauliffe SM, Morgan SL, Wyant GA, *et al.* Targeting Notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(43): 2939-2948.
- [31] Xie M, Zhang L, He CS, *et al.* Activation of Notch-1 enhances epithelial-mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(5): 1501-1513.
- [32] Mabertk, Cojoc M, Peitzsch C, *et al.* Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives [J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90(8): 659-677.
- [33] Fischer M, Yen WC, Kapoun AM, *et al.* Anti-DLL4 inhibits growth and reduces tumor-initiating cell frequency in colorectal tumors with oncogenic KRAS mutations [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1520-1525.
- [34] Noman AS, Uddin M, Rahman MZ, *et al.* Overexpression of sonic hedgehog in the triple negative breast cancer: clinicopathological characteristics of high burden breast cancer patients from Bangladesh [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18830.
- [35] Xu M, Gong AH, Yang HQ, *et al.* Sonic hedgehog-glioma associated oncogene homolog 1 signaling enhances drug resistance in CD44⁺ Musashi-1⁺ gastric cancer stem cells [J]. *Cancer Lett*, 2015, 369(1): 124-133.
- [收稿日期] 2016-02-05 [修回日期] 2016-06-15
[本文编辑] 顾文华